

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**UNA NUEVA ESTRATEGIA BASADA EN EL DISEÑO
DE FÁRMACOS MULTIDIANA PARA EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Pedro J. González Naranjo

Bajo la dirección de los doctores

**Nuria E. Campillo Martín
Juan A. Páez Prosper**

Madrid, 2013

**UNA NUEVA ESTRATEGIA BASADA EN EL
DISEÑO DE FÁRMACOS MULTIDIANA PARA
EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**

Pedro J. González Naranjo
IQM -CSIC

Memoria para optar al grado de Doctor

Directores de Tesis
Nuria E. Campillo Martín
Juan A. Páez Prosper

*En los momentos de crisis, sólo la imaginación
es más importante que el conocimiento.*

Albert Einstein

A mi futura sobrina Celia,

Agradecimientos

Dicen que la vida es lo que nos ocurre mientras hacemos planes. Esta Tesis, no fue pretendida ni buscada, simplemente surgió, contra todo pronóstico, escapando de la dictadura de las calificaciones, producto de casualidades, interés, desesperación, afecto, papeleo, oportunismo, trabajo, suerte y un montón de tiempo “desaprendiendo” sobre casi todo.

Pienso que tanto lo que somos, como donde llegamos, es gracias a todas las personas que han estado contigo en cada una de las etapas de tu vida, por lo que unos agradecimientos “justos” son casi imposibles de plasmar en unas pocas líneas. Por ello, solamente me voy a extender en las personas que han influido directamente en el desarrollo de esta Tesis.

A mis directores, Nuria E. Campillo y Juan Antonio Páez, por toda su ayuda y dirección en esta Tesis, por darme la oportunidad de investigar con ellos, pero sobre todo, por todo el apoyo que he recibido, tanto en el plano profesional como en el personal. Por vuestro ejemplo de inconformismo y de lucha. Por el “exceso de ambición” y por todo lo que habéis compartido conmigo. Muchísimas gracias a los dos.

A mis compañeras de laboratorio: Ángela, por ayudarme en los inicios y por su buen humor, y a Natalia, por su simpatía, su bendito orden y por ser un soplo de aire fresco en la última parte (siempre la más difícil) de mi Tesis.

A la Dra. Concepción Pérez, por su rapidez y eficiencia en la realización de los ensayos biológicos, y por su amabilidad, interés y trato personal.

Al grupo de la Dra. M^a Isabel Martín-Fontelles de la Universidad Rey Juan Carlos I, especialmente a las Drs. Rocío Girón Moreno y Eva M^a Sánchez Robles, por la elaboración de los estudios en tejido.

A los Drs. Mercedes González y Hugo Cerecetto, de la Universidad de la República de Uruguay, por la realización de los ensayos del Test de Ames y por su amabilidad y atención durante mi estancia en Río de Janeiro.

A la empresa Laboratorios Silanes I.D.F. S.L., en especial al Dr. Jorge Paniagua, por la ayuda prestada.

Al Dr. Juan Hermoso, que me “adoptó” en su grupo para la realización de la parte de cristalografía, y especialmente a Cesar y Alzo, nuevos amigos sin los que hubiera sido todo mucho más complicado.

A la Dra. Ana Martínez, por ayudarme tan amable y desinteresadamente con su financiación cuando la necesité.

Al departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM, por todas las facilidades dadas, en especial al Dr. José Carlos Menéndez Ramos.

A todos mis compañeros del IQM, especialmente mi generación (Fer, Wiki, Pili, Vir, Bea, Josito, Ainhoa, Guada, Magda, Andrea) por tantos momentos especiales, risas, fiestas, risas, ayudas, risas y apoyo (y más risas) en todo momento. También al resto de la gente, sobre todo de la comida (Sergio, Diego, Mario, Felipe, Oskía, Paco, Javi, Nieves, Diego, Bea).

A mi familia, especialmente a mi madre, por su apoyo y comprensión en todo momento, y a mi hermana (futura madre).

A mi nueva familia (Florentino, Marisa, Ana), por haberme acogido de una forma tan maravillosa.

A mis amigos de siempre (Ricki, Javi, Mones, Chus, Garea) por estar siempre ahí para hacerme la vida más fácil.

A mis amigas de la universidad (Henar, Pilar, Pili, Nathalie, Ana) por lo que hemos vivido y por todo lo que representan para mí.

A Silvio Streddi, mi hermano “berlinés”, por el diseño de la portada de la tesis (y por muchas cosas más)

A Amalia (gestión), Pablo, Araceli, Mayte, May (RMN), Tiko (microanálisis), Vicente Arán, Mari Tere (Congreso Lilly), Felipe Reviriego, Cumella, Kike Mann, Valle, a Berlín, Rio de Janeiro, Nueva Orleans, Nueva York, Lago Cayuga, a la placita y al Marpi, a Miguel y Sebastián, a Octavio, María, Eva y Emad (Erasmus), a Orlando, a Enrique, a Sarah, al Atleti, a Neo, al Teatro, a Sabina, Pereza y Extremoduro y, por supuesto, a Rizos.

A Rizos, Lauri, mi niña...que decirte, muchas gracias, por estar ahí, por enseñarme todos los días que existe otra forma de ser feliz, por apoyarme, soportarme, quererme y amarme... Te quiero!!!!

ABREVIATURAS

^{13}C -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
^1H -RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
AAI	Aminoalquilindol
AAPH	2, 2'-Azobis-(amidinopropano) dihidrocloruro
2-AG	2-Araquidonilglicerol
2-AGE	2-araquidonilgliceriléter o noladin éter
ABP	Bolsillo de unión acilo (<i>Acil Binding Pocket</i>)
ACEA	<i>N</i> -Araquidonil-2-cloroetilamida
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
AEA	Araquidonoiletanolamida o anandamida
Anal.	Microanálisis elemental
APP	Proteína precursora β -amiloide (<i>β-Amyloid Precursor Protein</i>)
Ar	Arilo
AS	Subsitio aniônico (<i>Anionic Site</i>)
ATP	Adenosintrifosfato
BuChE	Butirilcolinesterasa
c	Cuartete
CAS	Centro catalítico (<i>Center Active Site</i>)
CB1	Cannabinoide tipo 1
CB2	Cannabinoide tipo 2
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBE	Cannabielsoin
CBG	Cannabigerol
CBL	Cannabicitolol
CBN	Cannabinol

CBND	Cannabinodiol
CBR1	Receptor cannabinoide tipo 1
CBR2	Receptor cannabinoide tipo 2
CBRs	Receptores cannabinoides
CBT	Cannabitriol
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₃ CN	Acetonitrilo
ChE	Colinesterasa
d	Doblete
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enlace de hidrógeno
EM	Espectroscopía de masas
eq	Equivalentes
ES+	Electrospray positivo
EtOH	Etanol
FAAH	Hidrolasa de ácidos grasos
FDA	Agencia del medicamento USA (<i>Food and Drug Administration</i>)
GABA	Ácido-γ-aminobutírico
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G (<i>G Protein-Coupled Receptors</i>)
GSK-3β	Proteína glicógeno sintasa cinasa tipo 3β
H	Horas
HCL	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano
HPLC/MS	Cromatografía de alta resolución acoplada a un detector de masas
Hz	Hertzios
IC ₅₀	Concentración de producto a la que se ejerce un 50% de inhibición
IR	Infrarojo

IVIg	Inmunoglobulina intravenosa
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
LCP	Fase Cúbica Lípidica (<i>Lipid Cubic Phase</i>)
m	Multiplete
MeOH	Metanol
min.	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
NADA	<i>N</i> -araquidonildopamina
NBS	N-bromosuccinimida
nM	Nanomolar
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenglicol
P.f.	Punto de fusión
Ph	Interacción hidrofóba
PEI	Polietilenimina
ppm	Partes por millón
OAE	O-araquidonoiletanolamida ó virodamina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
OT	Agujero oxianiónico
OTG	Octil-tioglucósido
PAS	Centro periférico (<i>Periferic anionic site</i>)
Rto.	Rendimiento
s	Singlete

sa	Singlete ancho
SLS	Sincrotrón de Zürich, Suiza (<i>Swiss Light Source</i>)
SNC	Sistema nervioso central
Δ^8 -THC	Δ^8 -Tetrahidrocannabinol
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
Δ^9 -THCV	tetrahidrocannabivarina
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
tg	Tiempo de gradiente (HPLC)
tr	Tiempo de retención (HPLC)
THF	Tetrahidrofurano
TM	Hélice transmembranal
TNF- α	<i>Tumor necrosis Factor</i>
Trolox	ácido (\pm)-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromona-2-carboxílico
TRPV	Receptor vanilloide
UV	Ultravioleta
WIN	WIN55212-2
μ L	Microlitro

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IDEAS GENERALES	2
1.2. APLICACIÓN DE LAS TERAPIAS MULTIDIANA	6
1.3. SISTEMA CANNABINOIDE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	7
Ligandos Cannabinoides	8
<i>Agonistas de los receptores cannabinoides</i>	10
<i>Antagonistas de los receptores cannabinoides</i>	13
Aplicación de los cannabinoides en la enfermedad de Alzheimer	14
1.4. SISTEMA COLÍNERGICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	16
2. OBJETIVOS	19
3. ESTUDIO DE LOS CANNABINOIDES EN EL SISTEMA COLINÉRGICO	25
3.1. EFECTO DE LOS CANNABINOIDES EN LAS ENZIMAS COLINESTERASAS	29
3.2. ESTUDIO DEL MODO DE INHIBICIÓN DE LOS CANNABINOIDES SOBRE LAS ENZIMAS COLINESTERASAS	31
3.3. ESTUDIO MEDIANTE MODELIZACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE LOS CANNABINOIDES CON LAS ENZIMAS COLINESTERASAS AChE Y BuChE	35
3.4. CONCLUSIONES	45
4. DISEÑO DE CANNABINOIDES MULTIDIANA DERIVADOS DE ÉTERES DE INDAZOL	47

4.1. ANTECEDENTES. MODELOS TRIDIMENSIONALES DE LOS RECEPTORES	
CANNABINOIDES.....	49
4.2. MODELIZACIÓN DEL RECEPTOR CB2.....	52
4.3. DISEÑO DE NUEVOS CANNABINOIDES DERIVADOS DE INDAZOL.....	55
Cribado virtual mediante estudios de docking.....	57
5. QUÍMICA.....	63
5.1. ANTECEDENTES.....	64
5.2. SÍNTESIS DE ÉTERES DE INDAZOLILO.....	67
Introducción de nuevos grupos funcionales en el anillo aromático del indazol.....	77
5.3. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.....	79
6. FARMACOLOGÍA.....	85
6.1. EFECTO CANNABINOIDE.....	87
Estudios de desplazamiento de radioligando (<i>binding</i>).....	87
Estudios <i>in vitro</i> en tejido deferente de ratón.....	89
6.2. EFECTO COLINÉRGICO.....	96
Ensayos de inhibición enzimática.....	96
Estudios de competición.....	98
6.3. EFECTO NEUROPROTECTOR ANTIOXIDANTE.....	103
Ensayos ORAC.....	104
6.4. TOXICIDAD.....	105
Test de Ames.....	105
6.5. CONCLUSIONES.....	106

7. DOCKING	109
7.1. ESTUDIOS DE LOS COMPLEJOS CB2 – ÉTERES DE INDAZOL	113
7.2. ESTUDIOS DE LOS COMPLEJOS CHE-ÉTERES DE INDAZOL	118
Complejos éteres de indazol – BuChE	119
Complejos éteres de indazol – AChE	126
7.3. CONCLUSIONES	129
8. CRISTALIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB2	131
8.1.- INTRODUCCIÓN	132
8.2.- CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA	141
8.3.- RESULTADOS	146
9. CONCLUSIONES	149
10. PARTE EXPERIMENTAL	153
10.1.- QUÍMICA	154
Métodos generales	154
Síntesis	156
10.2.- FARMACOLOGÍA	184
A) EFECTO CANNABINOIDE	184
Ensayos de desplazamiento de radioligando	184
Ensayos <i>in vitro</i> en tejido deferente de ratón	186
B) EFECTO COLINÉRGICO	189
Ensayos de inhibición enzimática	189
Ensayos de competición	189

c) EFECTO NEUROPROTECTOR ANTIOXIDANTE.....	190
Ensayos ORAC.....	190
D) TOXICIDAD.....	192
Test de Ames.....	192
10.3. ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO TEÓRICO (<i>DOCKING</i>).....	194
10.4. CRISTALIZACIÓN.....	198
11. BIBLIOGRAFIA.....	201

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IDEAS GENERALES.

1.2. APLICACIÓN DE LAS TERAPIAS MULTIDIANA.

1.3. SISTEMA CANNABINOIDE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

1.4. SISTEMA COLÍNERGICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

1.1. IDEAS GENERALES.

La enfermedad de Alzheimer (EA), junto con el resto de demencias, ha pasado de ser la sexta causa de mortalidad en los países desarrollados en el año 2004 (3,4% mortalidad) a la cuarta en el 2008 (4,1%), de acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹. Aunque estas cifras son en sí mismas muy importantes, es todavía más relevante la repercusión debida a su tasa de morbilidad. El elevado número de personas que padecen la enfermedad causa un gran coste, no sólo económico sino también emocional, relacionado con el cuidado de estos pacientes. Se estima que alrededor del 6% de la población con edad superior a los 65 años sufre algún tipo de demencia, para un número total de personas afectadas cercano a los 36 millones, según datos de la OMS en el año 2009, al que se sumarían 4,6 millones de nuevos casos por año. Según estos datos, se estima que 81,1 millones de personas estarán afectadas en el año 2040².

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia, entre el 50-70% de todas las demencias, seguida por las demencias vascular, mixta y con cuerpos de Levy, según estudios realizados en países desarrollados³. La EA es un trastorno neurodegenerativo en el sistema nervioso central (SNC) que ocurre por lo general en personas de avanzada edad, caracterizado por un progresivo deterioro en las funciones cognitivas de manera irreversible. Clínicamente, esta enfermedad se caracteriza por provocar deterioro cognitivo, pérdida de memoria progresiva, desorientación y alteraciones en el lenguaje, todo ello acompañado por un comportamiento anormal y cambios de personalidad, llegando finalmente a la muerte del individuo.

Desde un punto de vista fisiopatológico, la EA se caracteriza por lesiones que se manifiestan por la aparición de depósitos proteínicos consistentes en placas neuríticas, compuestas por depósitos extracelulares de péptido β -amiloide (placas de β -amiloide) y por ovillos interneuronales formados por neurofibrillas, consistentes en filamentos enrollados de la proteína tau⁴⁻⁶.

Las placas corticales son densos núcleos protéicos rodeados por neuronas dañadas y/o destruidas, cuyo principal componente es el péptido β -amiloide, que es un derivado del dominio transmembranal de la región extracelular de la proteína precursora β -amiloide (APP)⁷, mientras que los nudos neurofibrilares están compuestos, principalmente, por filamentos de la forma hiperfosforilada de los microtúbulos asociados a la proteína tau⁸ y se encuentran dentro de neuronas y proyecciones neuronales (Fig. 1).

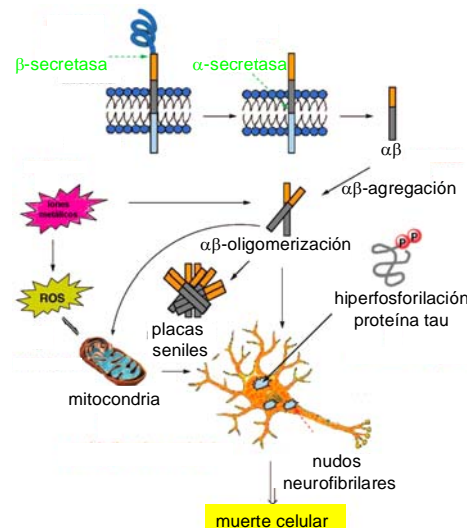


Figura 1. Representación esquemática de la hipótesis amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Adaptada de Melchione *et al.*⁹.

Una función biológica afectada en la EA es la neurotransmisión colinérgica, responsable de la mayor parte de las alteraciones cognitivas como consecuencia de un déficit de acetilcolina (ACh). Por tanto, los fármacos colinérgicos inhibidores de AChE, como el donepezilo (aricept), rivastigmina (exelon), o galantamina (reminyl) (Fig. 2) son los medicamentos de referencia para su tratamiento. Estos fármacos, si bien son los más prescritos, se recetan como tratamiento sintomático, con beneficios únicamente temporales, ya que la enfermedad continúa con su evolución¹⁰⁻¹³.

La única alternativa terapéutica disponible en la actualidad que actúa mediante un mecanismo diferente corresponde a la memantina (ebixa), un antagonista del receptor N-

metil-D-aspartato (NMDA) (Fig. 2). La memantina ejerce su modo de acción mediante el bloqueo de los efectos asociados con una anómala transmisión del neurotransmisor glutamato, seguido por el restablecimiento de la transmisión fisiológica asociada a un normal funcionamiento celular¹⁴. Mientras que los inhibidores de AChE se prescriben para el tratamiento de la EA suave a moderada, la memantina está indicada para la fase moderada o severa.

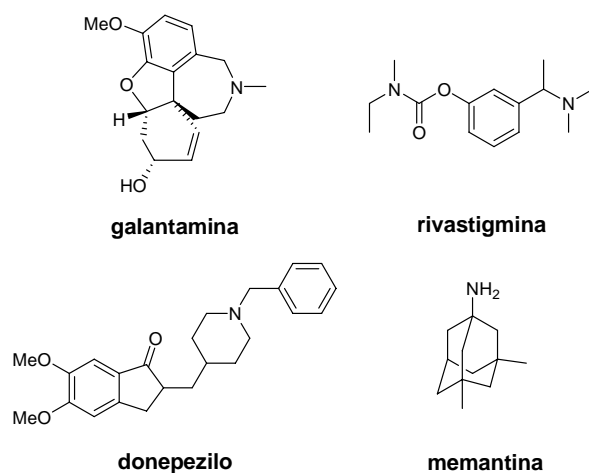


Figura 2. Estructuras de los principios activos de los medicamentos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El hecho de que en la enfermedad de Alzheimer se vean alterados un gran número de procesos y, además, no se conozca una clara relación entre el desarrollo de la enfermedad y las causas que la provocan, hace que existan muchas dianas susceptibles de ser el origen y la solución de la misma. En la actualidad, hay diferentes empresas farmacéuticas involucradas en el desarrollo en fase clínica de nuevos fármacos¹⁵⁻¹⁸. Los compuestos más interesantes que se han descrito en fase clínica II y III, se encuentran recogidos en la tabla 1.

Tabla 1. Fármacos para la enfermedad de Alzheimer que se encuentran ensayándose en fases clínicas II y III.

Fármaco	Fase Clínica	Modo de Acción Descrito	Empresa
Bapineuzumab	Fase III	Anticuerpo monoclonal humanizado del extremo N-terminal del péptido β -amiloide	Pfizer / Janssen
Solanezumab	Fase III	Anticuerpo monoclonal humanizado de la zona central del péptido β -amiloide	Eli Lilly
Inmunoglobulina intravenosa (IVIg)	Fase III	Aislada de sangre humana. que tiene propiedades anti- β -amiloide y anti-inflamatorias	Baxter
Scyllo-Inositol (ELND 005)	Fase II completada. Fase III en preparación	Previene o inhibe la agregación del péptido β -amiloide	Elan
Cloruro de metiltionilo (Rember)	Fase II completada. Fase III en preparación	No está claro, parece actuar mediante la inhibición de la fosforilación de la proteína tau o favoreciendo la desagregación del péptido β -amiloide.	TauRx Pharmaceuticals
Davenutide (AL-108)	Fase II completada	Estabilizante de microtúbulos. Inhibe la hiperfosforilación de la proteína tau y la formación de nudos neurofibrilares	Allon
Tideglusib (Nypta)	Fase IIb	Inhibidor de GSK-3 β , previene la hiperfosforilación de la proteína tau	Noscira
PBT2	Fase IIb	Quelante de iones metálicos. Inhibe la hiperfosforilación de la proteína tau y la agregación del péptido β -amiloide.	Prana Biotechnology
CERE-110	Fase II	Adenovirus que actúa a través del gen de factor de crecimiento neuronal (protección neuronal)	Ceregene
BMS-708163	Fase II	Inhibe la formación de γ -secretasa, y por tanto la formación del péptido β -amiloide.	Bristol-Myers Squibb
PF-04494700 (TTP488)	Fase II	Inhibidor del receptor RAGE, modula la actividad glial y reduce la formación de las placas de β -amiloide.	Pfizer

Además de estos compuestos, hay que mencionar además al Dimebon (Medivation Inc.), que actúa como inhibidor de las colinesterasas y del receptor NMDA, si bien los últimos resultados disponibles, resultantes de un gran estudio llevado a cabo en EEUU con pacientes de Alzheimer, fueron muy desalentadores, ya que no se pudo demostrar ningún beneficio significativo. Como consecuencia de estos estudios, Pfizer y Medivation (empresa biotecnológica con sede en California) han decidido poner fin a su acuerdo para desarrollar conjuntamente Dimebon.

Por otra parte, hay que resaltar al Tideglusib (Nypta), que ofrece una alternativa actuando en la enzima GSK-3 β y está siendo desarrollado por la empresa biotecnológica española Noscira.

A pesar del esfuerzo de la comunidad científica internacional en la búsqueda de un tratamiento efectivo para la enfermedad de Alzheimer, los resultados han sido escasos, sin que haya sido aprobado ningún nuevo fármaco desde el año 2003, cuando la FDA aprobó el uso clínico de la memantina. Ello, unido al hecho de que la mayoría de estas estrategias hayan ido enfocadas únicamente al péptido β -amiloide, ha producido cierto escepticismo en esta vía. En la actualidad, es difícil predecir cual será la estrategia que conduzca a la obtención de fármacos más eficaces a los actuales.

1.2. APLICACIÓN DE LAS TERAPIAS MULTIDIANA.

En el desarrollo de fármacos, existe la idea comúnmente aceptada de que un “hit” prometedor debe tener una alta afinidad (potencia) por el correspondiente receptor y una gran selectividad respecto a su modo de acción. Aunque todavía la mayor parte de las estrategias para la obtención de un fármaco siguen basándose en ésta idea, el concepto de fármaco multidiana, en el que una sola molécula interacciona con dos o más dianas terapéuticas al mismo tiempo, está adquiriendo cada vez mayor aceptación⁹. En un sentido similar se podría argumentar respecto a la necesidad de que un fármaco tenga una gran potencia. Existen estudios sobre fármacos multidiana con una menor afinidad

por un determinado receptor y, sin embargo, capaces de mostrar una mayor eficacia en cuanto a su acción respecto a fármacos selectivos y más potentes¹⁹.

Las limitaciones existentes en la eficacia de los fármacos altamente selectivos se hacen más patentes cuando nos enfrentamos a enfermedades complejas, tales como el cáncer o las enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SNC). En el tratamiento del cáncer, una estrategia terapéutica actual consiste en un coctel de fármacos que actúan en distintas dianas terapéuticas. Dada la complejidad de los desórdenes que afectan al SNC, el tratamiento mediante la aplicación de fármacos multidiana debe ser una estrategia a considerar, con el objetivo de hacer frente de una manera más eficaz al tratamiento de la enfermedad²⁰. Por ello, la obtención de nuevos compuestos capaces de interaccionar favorablemente con varias dianas farmacológicas, también conocidos como ligandos múltiples, supone un reto desde el punto de vista de la Química Médica.

En este contexto, los cannabinoides son una interesante familia a considerar debido a sus peculiares propiedades farmacológicas. La complejidad del sistema cannabinoide, caracterizado por la naturaleza promiscua de los ligandos endocannabinoides y sus metabolitos²¹, encaja perfectamente con el concepto de fármacos multidiana. Por otra parte, hay suficientes evidencias que indican la existencia de una estrecha relación entre el sistema cannabinoide y el SNC^{22, 23}.

1.3. SISTEMA CANNABINOIDE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

El sistema endocannabinoide es una organización compleja que comprende los receptores transmembranales CB1 y CB2, sus ligandos endógenos (conocidos como endocannabinoides), y los mecanismos de síntesis, transporte e inactivación de los mismos. Los ligandos cannabinoides exógenos (agonistas, antagonistas, agonistas inversos), son aquellas estructuras naturales o sintéticas que modifican a los receptores cannabinoides.

Hasta la fecha se han aislado e identificado dos receptores cannabinoides (CBRs), el receptor CB1 en 1990²⁴ y el receptor CB2 en 1993²⁵. Inicialmente se creía que el receptor CB1 estaba distribuido principalmente en el SNC, mientras que el receptor CB2 se encontraba localizado en el sistema periférico. Sin embargo, el receptor CB1 ha sido encontrado también en tejidos periféricos (sistema reproductor, cardiovascular²⁶) y el receptor CB2 en el sistema nervioso central²⁷⁻²⁹. Hasta la fecha, los receptores CB1 y CB2 no han sido cristalizados y no se conoce su estructura tridimensional, aunque existen numerosos modelos teóricos que serán comentados más adelante en el capítulo 4.

Ligandos Cannabinoides.

El término cannabinoide fue utilizado inicialmente para describir los compuestos tricíclicos de los productos naturales aislados de la planta *Cannabis sativa*, en donde el compuesto (-)- Δ^9 -*trans*-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) es el principal componente psicoactivo. La composición desde un punto de vista químico de la planta *Cannabis sativa* es muy compleja debido al gran número de componentes caracterizados. Contiene por lo menos 70 compuestos derivados de diterpeno, que se pueden clasificar en al menos 11 grupos³⁰ (Fig. 3): cannabigerol (CBG) (7 derivados), cannabicromeno (CBC) (5 derivados), cannabidiol (CBD) (7 derivados), (-)- Δ^9 -*trans*-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (9 derivados), (-)- Δ^8 -*trans*-tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC) (2 derivados), (CBL) cannabiciolol (3 derivados), cannabielsoin (CBE) (5 derivados), cannabinol (CBN) (7 derivados), cannabinodiol (CBND) (2 derivados), cannabitriol (CBT) (9 derivados), otros tipos (14 derivados).

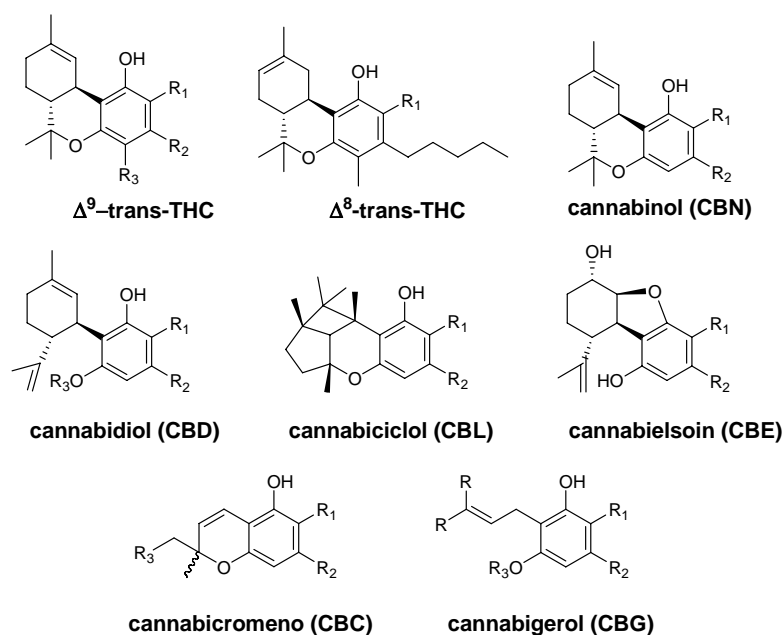


Figura 3. Estructuras de los principales fitocannabinoides.

El descubrimiento de los receptores cannabinoides y la existencia de cannabinoides selectivos y potentes, sugerían necesariamente la existencia de ligandos endógenos capaces de unirse a estos receptores. Efectivamente, dos años después de la clonación del primer receptor cannabinoide se produjo el aislamiento y caracterización del primer endocannabinoide, la araquidonoiletanolamida (AEA), comúnmente llamado anandamida³¹, y posteriormente del 2-araquidonoilglicerol (2-AG)^{32, 33}.

Otros endocannabinoides propuestos son el 2-araquidonilgliceriléter (2-AGE, noladin éter)³⁴, la O-araquidonoiletanolamina (OAE, virodamina)³⁵ y la N-araquidonoildopamina (NADA)³⁶ (Fig. 4), si bien el papel que desempeñan no está todavía suficientemente claro. Estos endocannabinoides desde un punto de vista químico son amidas, ésteres o éteres de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, que actúan como nuevos mediadores lipídicos. Los cannabinoides endógenos son metabolitos lipófilos del ácido araquidónico y son sintetizados, liberados, capturados y/o metabolizados en las células nerviosas. Su biosíntesis se realiza en función de la demanda por el organismo y sufren una rápida

degradación, por lo que su liberación se produce en las inmediaciones de su lugar de acción.

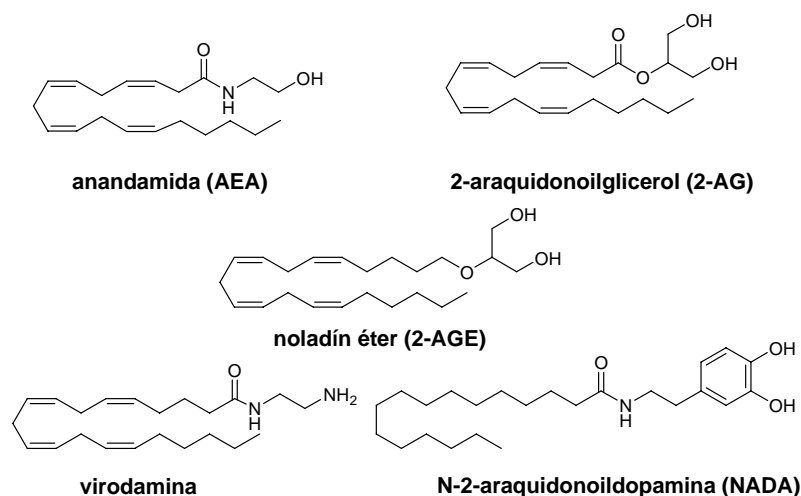


Figura 4. Estructuras de los principales endocannabinoides.

La anandamida (AEA) es sintetizada por las neuronas postsinápticas y se une a los receptores CB1 y CB2³⁷ aunque su afinidad por el receptor CB2 es aproximadamente cuatro veces menor que para el receptor CB1³⁸. Los niveles más altos de anandamida se encuentran en las áreas del cerebro con altas densidades de CBRs, tales como el hipocampo, el *striatum*, el cerebelo y la corteza. El 2-araquidonoilglicerol (2-AG) es el segundo endocannabinoide aislado^{32, 33} y se comporta como agonista de los receptores CB1 y CB2 con una afinidad similar para ambos^{32, 39}. Aunque el 2-AG exhibe una afinidad más baja para el CBR1 que la anandamida, se comporta como un agonista total mientras que la anandamida muestra un agonismo parcial frente a CBR1, estando además presente en el cerebro a niveles más altos, por lo que es considerado como el agonista endógeno primario para los receptores CB1 y CB2.

Agonistas de los receptores cannabinoides.

Desde un punto de vista químico, los agonistas de los receptores cannabinoides se pueden clasificar en diversos grupos: *fitocannabinoides*, que incluyen productos naturales

aislados de *Cannabis sativa*, análogos sintéticos de los cannabinoides naturales (sistemas generalmente bicíclicos que carecen de un anillo), como el CP-55,940⁴⁰ y los aminoalquilindoles, siendo el WIN55212-2 el miembro más conocido³⁸. Además de estos grupos, que son los más representativos, existen otros compuestos con diferentes estructuras químicas que han demostrado características cannabinoides y son actualmente tema de investigación^{22, 41, 42}.

Los *fitocannabinoides*, son derivados naturales tricíclicos que incluyen al Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)⁴³ y a otros compuestos farmacológicamente activos de la planta *Cannabis sativa* que carecen del anillo de benzopirano. El Δ^9 -THC, que es el principal componente psicotrópico del cannabis, es un agonista parcial del receptor CB1 y CB2^{44, 45}. El cannabinol se une con una mayor afinidad a ambos receptores pero con una selectividad modesta⁴⁶, mientras que el Δ^9 -THCV (tetrahidrocannabivarina) se comporta como un potente agonista parcial del receptor CB2⁴⁷. Actualmente, el cannabidiol (CBD) está siendo muy estudiado como consecuencia de sus peculiares efectos farmacológicos, ya que se comporta como antagonista CB1 y agonista CB2 en determinados ensayos biológicos⁴⁷⁻⁵⁰.

A principios de los 80, se desarrolló una segunda clase de cannabimiméticos basándose en la estructura del Δ^9 -THC (Fig. 5). Existen muchos compuestos tricíclicos o bicíclicos descritos con características cannabinoides, con baja selectividad CB1/CB2, siendo los más representativos la nabilona⁵¹, el CP-55,940⁵² y el HU-210^{53, 54}. Éste último, sintetizado por el grupo de Mechoulam, es uno de los agonistas más potentes⁵⁵. También hay que destacar al compuesto CP-55,940, por su utilización como compuesto de referencia para la evaluación de los cannabinoides en los ensayos de binding^{56, 57}. Asimismo, se han descrito numerosos cannabinoides que han demostrado selectividad por el receptor CB2. Entre ellos, se pueden citar los cannabinoides agonistas completos (*full* agonistas) JWH-133^{58, 59} y HU-308⁶⁰ que tienen una alta afinidad para el receptor CB2 y muy baja para el receptor CB1.

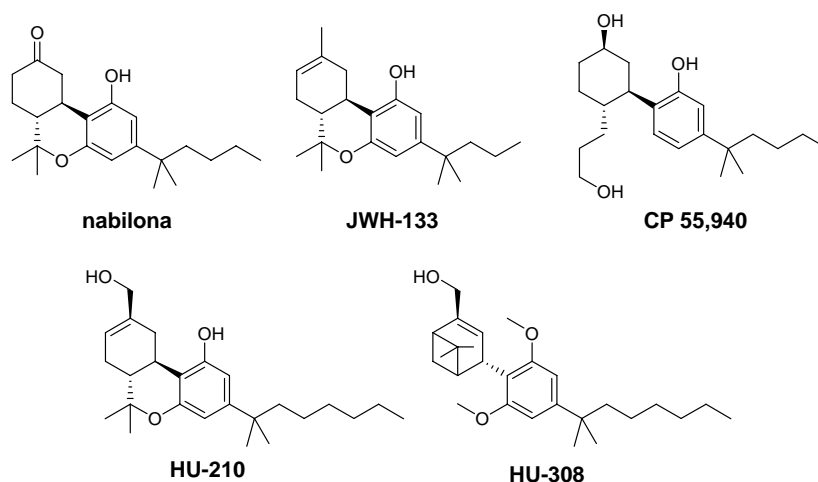


Figura 5. Estructuras de los principales agonistas cannabinoides sintéticos basados en la estructura del Δ^9 -THC.

Una tercera clase química de cannabinoides corresponde a los aminoalquildindoles, desarrollados en los años 80 por Sterling Winthrop como antiinflamatorios no esteroideos. Así, en 1992 se publicó que la pravadolina ((4-metoxifenil)-[2-metil-1-(2-morfolin-4-iletil)indol-3-il])⁶¹ y otros derivados de indol eran también capaces de unirse a los receptores cannabinoides con una mayor afinidad que el WIN55212-2^{38, 62}. Este compuesto, aunque no es muy útil desde un punto de vista farmacológico, se utiliza generalmente como referencia para la evaluación de potenciales cannabinoides. Desde entonces, una gran cantidad de derivados de indol han sido sintetizados por modificación estructural de las diferentes posiciones del anillo^{42, 43, 63}. De entre todos ellos, los más interesantes de acuerdo a su afinidad y selectividad CB2 son: el JWH-015 (2-metil-1-propil-3-(1-naftoil)indol)⁶⁴, el L768242 o GW405833 (1-(2,3-diclorobenzoil)-2-metil-5-metoxi-3-(2-[1-morfolino]etil)indol)⁶⁵, y finalmente, el A-796260 1-[(2-[1-morfolino]etil)-1'-indol-3-il]-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona⁶⁶ (Fig. 6).

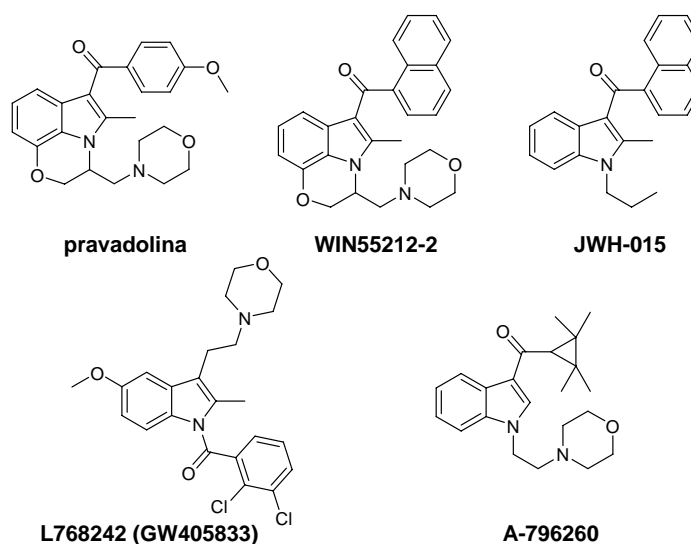


Figura 6. Estructuras de los principales agonistas cannabinoides sintéticos de la familia de aminoalquilindoles (AAI's).

Además, se han descrito otras familias de compuestos, con alta afinidad para los receptores cannabinoides pero con modesta selectividad CB2, como son los derivados del resorcinol⁶⁷, naftoilpirrol⁶⁸, indolopiridona⁶⁹ o naftiridinona-3-carboxamida⁷⁰.

Con una mayor selectividad CB2, las familias más relevantes descritas que se pueden citar corresponden a derivados de arilsulfonamida^{71, 72}, de quinolina, como por ejemplo los compuestos 4-oxo-quinolin-3-carboxamida⁷³ y 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida⁷⁴, de quinolizina (Sch35966; 8,10-bis[(2,2-dimetil-1-oxopropil)oxi]-11-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6H-benzo[b]quinolizina-6-ona)⁷⁵, de tiazina (2-fenilimino-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina)^{76, 77} o de pirimidina (GW-842166X; 5-pirimidincarboxamida)⁷⁸.

Antagonistas de los receptores cannabinoides.

Hay un gran número de trabajos y revisiones referidos a compuestos antagonistas cannabinoides⁷⁹⁻⁸⁶, especialmente los relacionados con los 1,2-diarilpirazoles, familia a la que pertenecen el SR141716A (Rimonabant; Acomplia®), descrito en 1994 por Sanofi como antagonista selectivo CB1⁸⁷⁻⁹⁰ y el AM251⁹¹. Otros antagonistas que se pueden

mentar son los aminoalquilindoles (AAls), como el AM630, primer antagonista selectivo descrito del receptor CB2⁹² (Fig. 7).

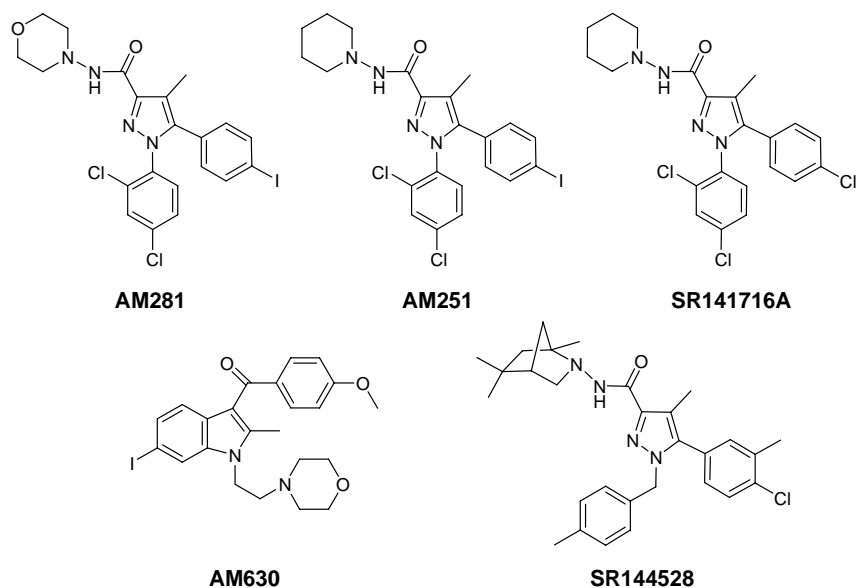


Figura 7. Estructuras de los principales antagonistas cannabinoides sintéticos.

Aplicación de los cannabinoides en la enfermedad de Alzheimer.

El interés terapéutico del sistema cannabinoide en relación con la enfermedad de Alzheimer (EA), se pone de manifiesto por las alteraciones patofisiológicas que se producen durante la evolución de la enfermedad. Por un lado, se ha visto que en cerebros *postmortem* de pacientes de Alzheimer, el sistema cannabinoide se encuentra alterado. Esta alteración a nivel del receptor CB1 no está tan clara, existiendo cierta controversia^{41, 93}, ya que algunos estudios sugieren que el receptor CB1 se encuentra intacto en la EA⁹⁴, mientras que otros indican que la expresión y distribución de los receptores CB1 es claramente diferente⁹⁵. Respecto al receptor CB2, se ha comprobado que está anormalmente sobreexpresado en placas neuríticas asociadas a astrocitos y selectivamente expresado en la microglía^{94, 96, 97}.

Por otro lado, se ha descrito tanto *in vitro* como *in vivo*, que los agonistas cannabinoides CB1 pueden prevenir la excitotoxicidad mediante la activación del receptor CB1⁴¹. En este sentido, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que ciertos agonistas CB1 pueden prevenir la neurotoxicidad inducida por el péptido β -amiloide. En cuanto a los receptores CB2, se han descrito distintos efectos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, por lo que podría ser una posible diana para la búsqueda nuevos tratamientos para esta enfermedad⁴¹. En primer lugar, la estimulación de los receptores cannabinoides CB2 produce una supresión de procesos neuroinflamatorios, tanto por la reducción en la expresión de CD40, como por la reducción de óxido nítrico y la producción de TNF- α (*tumor necrosis factor α*) en la microglía activada^{93, 98}. En segundo lugar, ciertos agonistas cannabinoides como el JWH-015 pueden inducir la eliminación del péptido β -amiloide en células de microglía en modelos de EA *in vitro*^{94, 99}, mediante la potenciación de la función fagocítica microglial⁹⁹ y la estimulación de macrófagos humanos⁹⁴. Este efecto, además, podría conducir a una reducción en la hiperfosforilación de la proteína tau¹⁰⁰⁻¹⁰², ya que este proceso ocurre bien por la vía del estrés oxidativo o bien mediante la activación de la proteína GSK3 β ¹⁰³, ambas vías relacionadas con el sistema cannabinoide^{102, 104}. En tercer lugar, la activación de la microglía puede ser reducida por la acción de agonistas CB2 como cannabidiol, WIN55212-2 y JWH-133⁵⁰. En relación con esto último, se ha observado también que agonistas CB1/CB2 conducen a una mejora en el rendimiento de la memoria en ratas, tanto en modelos de EA como en ratas con un envejecimiento normal^{95, 98}. Por último, destacar que otras evidencias revelan que agonistas CB2 pueden suprimir la inflamación tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante la activación del receptor CB2⁹⁹.

Además de todos estos estudios que prueban la relación existente entre el sistema cannabinoide y la enfermedad de Alzheimer, los cannabinoides han demostrado, un claro efecto neuroprotector contra hipoxia aguda, excitotoxicidad y contra daños oxidativos y traumáticos tanto *in vitro* como *in vivo*^{99, 105-108}.

Asimismo, otro proceso importante estudiado en los últimos años que puede dar lugar al hallazgo de un tratamiento eficaz contra las enfermedades neurodegenerativas, es la capacidad de generación de nuevas neuronas en adultos¹⁰⁹. Inicialmente, se describió que el sistema cannabinoide estaba involucrado en este proceso a través de los receptores CB1¹¹⁰, pero recientemente se ha descrito también que la activación de los receptores CB2 por el agonista HU-308 también promueve la proliferación y diferenciación neuronal¹¹¹.

1.4. SISTEMA COLINÉRGICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

El primer intento de encontrar una explicación biológica a la EA fue a principios de los años 80, con la “hipótesis del déficit colinérgico”, basada en la evidencia de alteraciones del sistema colinérgico en enfermos de Alzheimer, en los que existe una disminución en su actividad¹⁰⁻¹³. Esta hipótesis supone que la mayor parte de las alteraciones cognitivas ocurren como consecuencia de un déficit de acetilcolina (ACh), uno de los transmisores más importantes. La hidrólisis de la ACh se realiza a través de la formación de un intermedio acil-enzima, y los inhibidores pueden afectar a la cinética de este estado estacionario por la asociación con el intermedio de acilo, además de a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato.

El sistema colinérgico es uno de los sistemas moduladores más importantes de la transmisión neuronal en el cerebro, regulando funciones cognitivas como la memoria, el aprendizaje, la arborización dendrítica y el desarrollo y diferenciación neuronal^{112, 113}. Su principal neurotransmisor es la acetilcolina que es degradada a colina y acetato, mediante las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) (Fig. 8). La AChE (EC 3.1.1.7) y la BuChE (EC 3.1.1.8) son dos proteínas homólogas, con un porcentaje de identidad en la secuencia de aproximadamente el 50%. El centro activo de ambas enzimas, se encuentra dividido en varias zonas muy próximas entre sí. Por un lado, existe una cavidad en cuya base está la tríada catalítica (Ser-His-Glu) que forma el centro catalítico llamado CAS (*Center Active Site*) y que se encuentra conservado en ambas

enzimas. Además, existe otro centro activo claramente identificado, llamado PAS (*Periferic Anionic Site*), situado en la entrada de la cavidad.

Además, el sistema colinérgico, a través de las enzimas AChE y BuChE, está involucrado en otras funciones no-colinérgicas, como la estimulación de la formación de las placas del β -amiloide. Existen estudios que demuestran que a través de su sitio periférico (PAS), la AChE tiene la capacidad de inducir la formación de fibras $\alpha\beta$, mediante cambios conformacionales que se producen tras su unión al péptido¹¹⁴⁻¹¹⁶. Así, la AChE actuaría como una especie de “chaperona”, dando lugar a la creación de estas fibras. Por tanto, el efecto de un inhibidor de AChE a través de su sitio periférico (PAS), podría conducir a la prevención de la enfermedad, mediante un bloqueo en la formación de estos péptidos¹¹⁷ (Fig. 8).

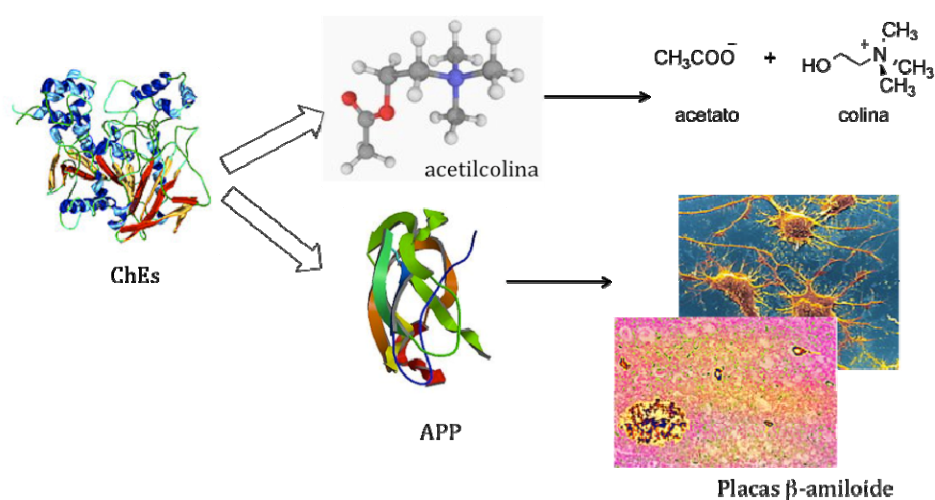


Figura 8. Implicación del sistema colinérgico en la enfermedad de alzheimer.

En cuanto a la butirilcolinesterasa (BuChE), diferentes estudios sugieren que dicha enzima desempeña un papel activo en el proceso de formación de los depósitos de amiloide. Por un lado se ha observado que la BuChE se asocia con las placas en el punto de maduración, donde éstas se transforman de una forma benigna, difusa, a la forma

neurotóxica compacta, asociada con la enfermedad patológica¹¹⁸. Por otro lado se ha demostrado que los inhibidores selectivos de la enzima butirilcolinesterasa como la cimserina, causan una inhibición prolongada de esta enzima en el cerebro de los ratones causando un aumento en los niveles de acetilcolina extracelular, sin provocar efectos inhibidores en la acetilcolinesterasa (AChE)¹¹⁸. También se ha descrito que en cultivos de células humanas de neuroblastoma, se reduce la proteína precursora β -amiloide intracelular y extracelular, así como los niveles de péptido β -amiloide secretado, sin interferir en la viabilidad celular. En este mismo estudio, el tratamiento de ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína precursora amiloide mutada, también mostró una disminución en los niveles cerebrales de β -amiloide en comparación con los animales no tratados¹¹⁹.

Además, se ha observado que el contenido de la enzima BuChE en el cerebro aumenta con la edad, mientras que el de la AChE presenta una tendencia inversa¹¹⁹. La actividad catalítica de BuChE, por lo tanto, puede desempeñar un papel más destacado en la hidrólisis de acetilcolina en el cerebro envejecido, lo que sugiere que la inhibición de dicha enzima puede tener un mayor impacto sobre la neurotransmisión colinérgica en los ancianos. La presencia de esta enzima en las placas amiloides y marañas neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer (EA), ha sido confirmada ahora por numerosos investigadores. Parece razonable suponer que esta enzima es un producto glial y que su localización en las placas y marañas puede ser el resultado de los procedimientos inflamatorios globales relacionados con la EA. Así, la interferencia con la actividad de esta enzima (catalítica o no catalítica) representa una estrategia terapéutica prometedora para influir en el transcurso de los procedimientos neuropatológicos en la enfermedad de Alzheimer^{120, 121}.

2. OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer (EA) tiene una repercusión económica y social de una enorme magnitud, difícilmente cuantificable y para la que no existe una solución terapéutica eficaz. La búsqueda de nuevos tratamientos alternativos constituye un área prioritaria de investigación en todos los campos relacionados con el conocimiento de este tipo de enfermedades.

En este proyecto se plantea como hipótesis una nueva estrategia, no explorada hasta la fecha, para el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y se refiere al desarrollo de nuevos agonistas cannabinoides multidiana, con efecto tanto en el sistema cannabinoide como en el colinérgico. Es importante mencionar que, aunque cada una de estas dianas está siendo estudiada de manera individual como posibles blancos farmacológicos, utilizando la estrategia clásica de búsqueda de compuestos de alta selectividad y potencia, nuestro grupo de investigación ha sido el primero en proponer esta estrategia como un posible tratamiento para la EA (Fig. 9).

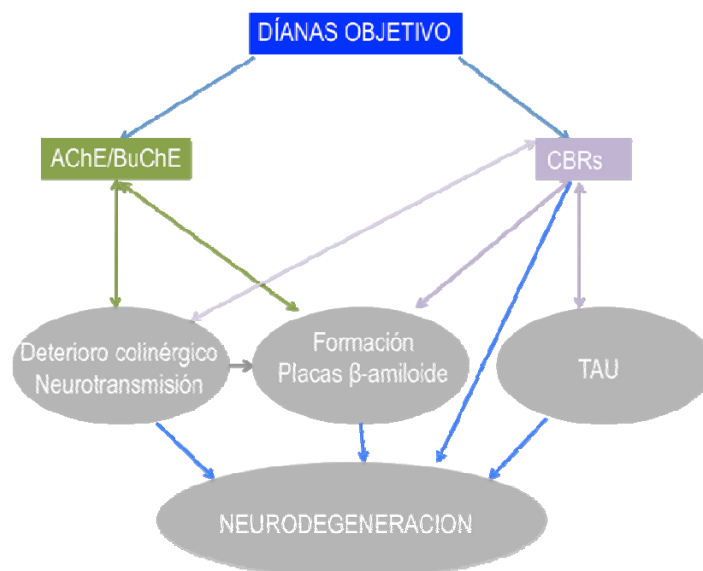


Figura 9. Representación esquemática de la hipótesis de partida en el diseño de fármacos multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En el marco de lo expuesto en el anterior capítulo, la hipótesis planteada en este trabajo de investigación se basa en las siguientes premisas:

a) Los agonistas cannabinoides pueden proteger a las neuronas de los efectos tóxicos de los depósitos de amiloide, pueden inducir la eliminación del péptido $\alpha\beta$ y son capaces de reducir la fosforilación de la proteína tau. Los cannabinoides han demostrado también un claro efecto neuroprotector contra la hipoxia aguda, la excitotoxicidad y los daños oxidativos, además de promover la generación y diferenciación neuronal.

b) La enzima acetilcolinesterasa (AChE) constituye una diana fundamental para el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Alzheimer. Su acción está relacionada con el déficit colinérgico que sucede en las diferentes etapas de la enfermedad, así como con la inhibición de la agregación del péptido $\alpha\beta$. Asimismo, se ha demostrado que la BuChE juega un papel importante en la EA, siendo por tanto un objetivo interesante en la búsqueda de nuevas soluciones terapéuticas para esta enfermedad.

c) Existe un precedente donde se describe experimentalmente la actividad inhibidora del compuesto fitocannabinoide Δ^9 -THC sobre la enzima AChE de *electrophorus electricus* mediante un mecanismo de tipo competitivo¹²².

En este contexto, el objetivo fundamental de este trabajo es el desarrollo de agonistas cannabinoides que actúen simultáneamente en el sistema colinérgico como inhibidores de AChE / BuChE. Con este fin, se plantearon una serie de objetivos concretos que se describen brevemente a continuación:

1. Estudio del efecto de los cannabinoides en el sistema colinérgico. Estudio de la acción de los ligandos cannabinoides más representativos sobre el sistema colinérgico, para determinar la capacidad inhibitoria en la AChE/BuChE, tanto a nivel experimental (determinación de la K_i , estudios cinéticos) como teórico (estudios de docking).

2. Diseño de nuevos cannabinoides derivados de éteres de indazol.

Basándose en la estructura de los cannabinoides de tipo aminoalquilindol (AAIs, Fig. 6), se propuso como estructura base, el sistema heterocíclico de éter de indazol (Fig. 10). Para el diseño de las moléculas, se estudiará la interacción de los éteres de indazol considerados, con el modelo tridimensional del receptor cannabinoide CB2, mediante estudios de anclaje o *docking*. Las moléculas elegidas como referencia fueron el WIN55212-2 (agonista CB1/CB2) y el JWH-015⁶⁴ (agonista CB2) (Fig.10).

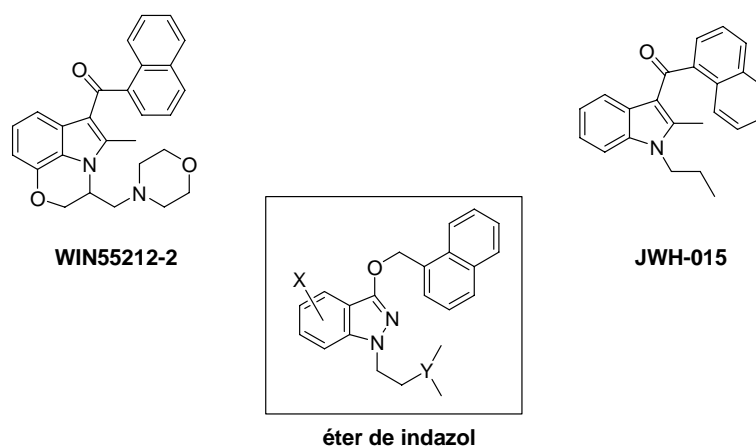


Figura 10. Estructura de los principales aminoalquilindoles y de la estructura objetivo, éter de indazol.

3. Síntesis de los derivados de éteres de indazol. Preparación de un conjunto representativo de éteres de indazol que permitan explorar la potencialidad cannabinoide del sistema (Fig. 11).

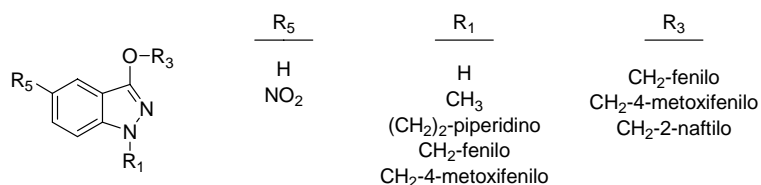


Figura 11. Modificaciones iniciales propuestas sobre el sistema de éter de indazol para explorar su actividad cannabinoide.

4. Estudio farmacológico de los éteres de indazol.

4.1. Efecto cannabinoide. Las moléculas de sintetizadas serán evaluadas mediante ensayos de desplazamiento de radioligando y en tejido aislado.

4.2. Efecto Colinérgico. Se determinará la actividad enzimática de cada compuesto como inhibidor de la AChE/BuChE.

5. Estudio cristalográfico. En la presente memoria, se plantea abordar el estudio estructural de los receptores cannabinoides mediante estudios cristalográficos. Para ello se pretende la obtención de cristales adecuados que permitan la realización de un espectro de difracción de rayos X para el establecimiento de la estructura tridimensional del receptor cannabinoide CB2.

3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS CANNABINOIDES EN EL SISTEMA COLINÉRGICO.

3.1. EFECTO DE LOS CANNABINOIDES EN LAS ENZIMAS COLINESTERASAS AChE Y BuChE.

3.2. ESTUDIO DEL MODO DE INHIBICIÓN DE LOS CANNABINOIDES SOBRE LAS ENZIMAS COLINESTERASAS AChE Y BuChE.

3.3. ESTUDIO MEDIANTE MODELIZACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE LOS CANNABINOIDES CON LAS ENZIMAS COLINESTERASAS AChE Y BuChE.

3.4. CONCLUSIONES.

Con objeto de desarrollar nuevos fármacos multidiana, se realizó un estudio farmacológico para determinar el efecto de los ligandos cannabinoides en el sistema colinérgico. Existen distintos estudios sobre la promiscuidad de los endocannabinoides y la relación de los cannabinoides con otros sistemas biológicos, pero, en relación al sistema colinérgico, únicamente se ha descrito experimentalmente que el Δ^9 -THC inhibe a la acetilcolinesterasa (AChE) de *electrophorus electricus* mediante un mecanismo de tipo competitivo¹²².

Para la realización de este estudio, se hizo una selección de los cannabinoides endógenos y de los cannabinoides más representativos, en función de su estructura química y de sus propiedades farmacológicas, para determinar su comportamiento en el sistema colinérgico como inhibidores de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y/o butirilcolinesterasa (BuChE).

Teniendo en cuenta que los agonistas cannabinoides son los compuestos más interesantes para la enfermedad de Alzheimer, el estudio fue enfocado principalmente sobre estos ligandos, eligiendo representantes de cada familia, además de incluir un agonista inverso y dos antagonistas, como complemento del trabajo (Fig. 12).

De los denominados fitocannabinoides el cannabinoide estudiado fue el Δ^9 -THC, principal componente psicotrópico del cannabis, con propiedades de agonista parcial sobre ambos receptores cannabinoides (CB1 y CB2)^{38, 46, 123}.

Dentro del grupo de los análogos sintéticos de los cannabinoides naturales se seleccionó el ligando cannabinoide CP-55,940⁴⁰. Este compuesto es el más utilizado para la evaluación de cannabinoides en ensayos de unión (*binding*), comportándose como un agonista de mayor potencia que el Δ^9 -THC^{56, 57}. También se ha incluido en el estudio un análogo tricíclico del Δ^8 -THC, el JWH-133^{58, 59} por su gran afinidad por el receptor CB2 y baja afinidad por el receptor CB1.

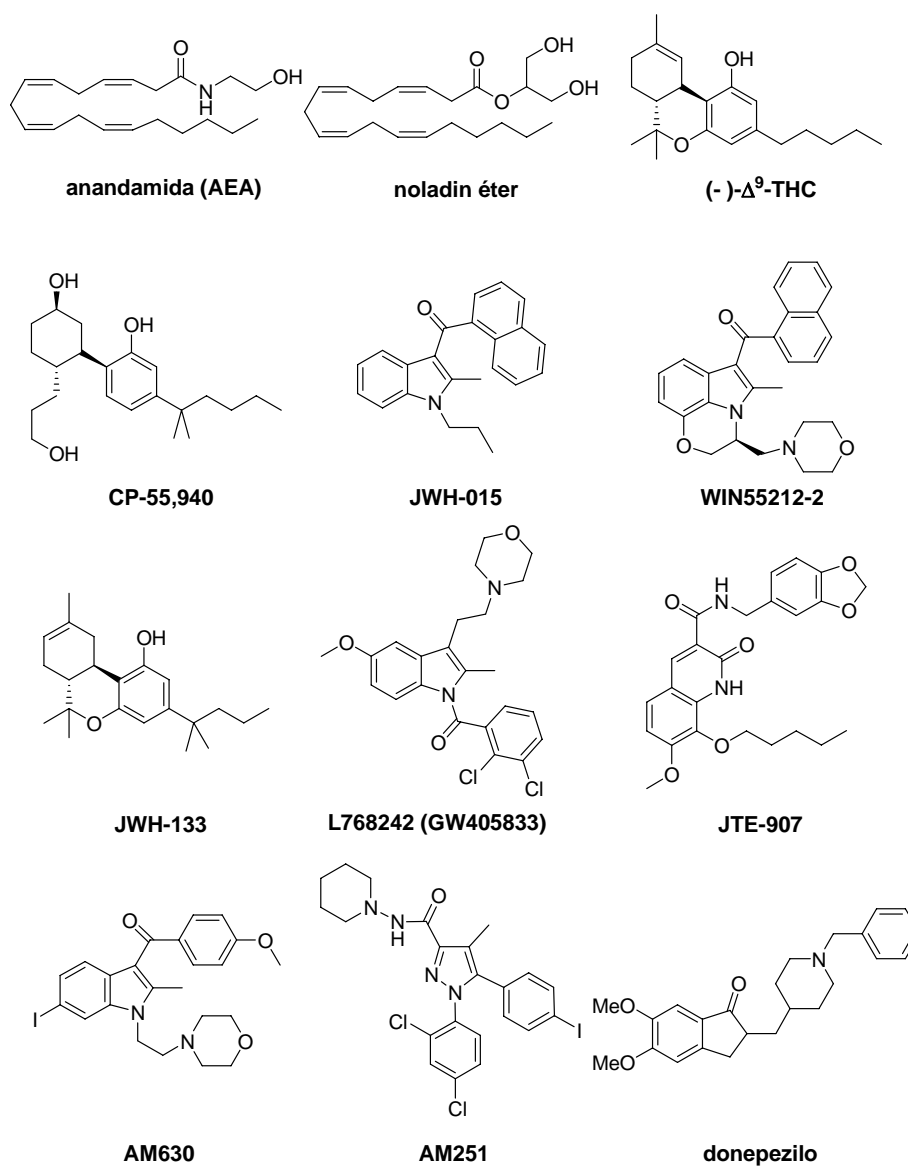


Figura 12. Estructuras de los ligandos cannabinoides y del donepezilo (inhibidor AChE).

Una tercera familia de los cannabinoides estudiados es el grupo de los aminoalquilindoles (AAI). De este grupo se seleccionó el compuesto WIN55212-2, como potente agonista CB1 y CB2, con una ligera selectividad por el receptor CB2^{38, 62}. Además, fueron también incluidos en el estudio otros dos compuestos representativos, el derivado JWH-015⁶⁴ y el compuesto L768242⁷⁸, que poseen entre sus características un alto grado de selectividad hacia el receptor CB2 (Fig.12).

Para completar la selección de ligandos cannabinoides, se incluyeron las dos moléculas más representativas dentro del grupo de los endocannabinoides o ligandos endógenos, que son la anandamida y el noladin éter. La anandamida (AEA o araquidoniletanolamida)³¹ se une a ambos receptores (CB1 y CB2)³⁷ si bien su afinidad por el receptor CB2 es aproximadamente cuatro veces menor que por el receptor CB1³⁸. Por el contrario, el noladin éter (2-araquidonilgliceril éter), un endocanabinoide tipo éter, tiene una mayor afinidad por el receptor CB2 que por el receptor CB1.

Además de todos estos agonistas, se incluyó una estructura química particular con propiedades cannabinoides y objeto de intensas investigaciones, como el JTE-907. Este derivado se ha caracterizado como un potente agonista inverso altamente selectivo del receptor cannabinoide CB2^{46, 124}.

Finalmente, fueron también incluidos en el estudio dos antagonistas de los receptores cannabinoides, el AM251⁹¹ antagonista selectivo CB1 de la familia de los 1,2-diarilpirazoles y el AM630, primer antagonista descrito con selectividad CB2⁹², perteneciente a la familia de los aminoalquilindoles (Fig. 12). En la tabla 2 se muestran las constantes de afinidad y la selectividad de los compuestos seleccionados.

Tabla 2. Constantes de afinidad y selectividad de los ligandos cannabinoides estudiados en los receptores CB1 y CB2.

Compuesto	K_d (nM) CB1	K_d (nM) CB2	Selectividad CB2 / CB1	Referencia
Anandamida	89 ± 10	371 ± 102	0,2	123
Noladin éter	$21,2 \pm 0,5$	>3	< 7	34
Δ^9-THC	21	36,4	0,6	123
CP-55,940	3,72	2,55	1,5	38
JWH-133	677 ± 132	$3,4 \pm 1,0$	199	59
WIN55212-2	$1,9 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,2$	6,8	123
JWH-015	336 ± 36	$13,8 \pm 4,6$	24,3	64
L768242	1917 ± 381	$12 \pm 0,2$	160	78
JTE-907	2370 ± 297	$35,9 \pm 7,32$	66	46
AM251	7,49	2290	0,003	91
AM630	5152 ± 567	$31,2 \pm 12,4$	165	92

3.1. EFECTO DE LOS CANNABINOIDES EN LAS ENZIMAS AChE Y BuChE.

Los efectos de inhibición de todos los cannabinoides seleccionados, fueron estudiados en las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), de procedencia humana, mediante el método descrito por Ellman *et al.*¹²⁵ usando donepezilo como compuesto de referencia. Los valores de IC_{50} para la inhibición de la AChE y BuChE se indican en la tabla 3.

En las condiciones del ensayo (ver parte experimental, sección 10.2), los agonistas cannabinoides anandamida, noladin éter y WIN55212-2 y los antagonistas AM251 y AM630, mostraron una baja solubilidad, por lo que no fue posible la determinación cuantitativa de los valores de IC_{50} . Para el resto de los cannabinoides estudiados se obtuvieron valores de IC_{50} en el rango micromolar para AChE y/o BuChE, confirmándose así su capacidad inhibitoria. Teniendo en cuenta los valores de IC_{50} obtenidos, el Δ^9 -THC y el análogo sintético JWH-133, son los cannabinoides que presentan una mayor actividad como inhibidores de la AChE, mientras que CP-55,940 muestra una mayor inhibición de la BuChE en relación a la AChE, con una selectividad ocho veces mayor.

Tabla 3. Concentración a la que se alcanza un 50% de inhibición sobre las enzimas AChE y BuChE (IC_{50} , μM) de los cannabinoides estudiados.

Compuesto	IC_{50} / μM AChE humana	IC_{50} / μM BuChE equina	IC_{50} / μM BuChE humana
Anandamida	>10	>10	>10 (23%) ^a
Noladin éter	>10	>10	>10
Δ^9-THC	2,96 \pm 0,04	33,8 \pm 5,97	>10
CP-55,940	96,0 \pm 7,39	7,25 \pm 0,38	11,46 \pm 1,38
JWH-133	4,37 \pm 0,76	>10	>10
WIN55212-2	>100	\geq 100 (49%)	>100
JWH-015	>15 (35%)	4,3 \pm 0,3	4,67 \pm 0,63
L768242	>15	14,69 \pm 2,90	>15 (33%)
JTE-907	7,53 \pm 0,38	>10	>10
AM251	>10	>10	>10
AM630	>10	>10	>10
Donepezilo	0,010 \pm 0,002	2,5 \pm 0,07	ND ^b
Rivastigmina	48,0 ^c	ND	54,0 ^c

^aEntre paréntesis se indica el porcentaje de inhibición al valor de concentración indicado; ^bNo determinada. ^cReferencia¹²⁶.

Analizando los datos de actividad recogidos en la tabla 3, se puede sugerir que, los cannabinoides, en función de su estructura, se comportan como inhibidores de las enzimas AChE y/o BuChE. Así, los agonistas cannabinoides tricíclicos JWH-133 y Δ^9 -THC presentan una actividad inhibitoria moderada sobre las AChE, con una selectividad de alrededor de 10 veces superior frente a la BuChE por parte de este último. Por otra parte, destacar que el agonista inverso JTE-907 se comporta como inhibidor de la AChE. Finalmente señalar que tanto los aminoalquilindoles (AAls) L768242 y JWH-015 como el agonista CP-55,940 se comportan como inhibidores de la enzima BuChE, destacando este último compuesto, con una selectividad cercana a 10 en relación con la enzima AChE.

3.2. ESTUDIO DEL MODO DE INHIBICIÓN DE LOS CANNABINOIDES SOBRE LAS ENZIMAS AChE Y BuChE.

Como se ha comentado en la introducción, es conocido que tanto la acetilcolinesterasa (AChE) como la butirilcolinesterasa (BuChE) presentan dos centros activos (CAS y PAS) involucrados en diferentes aspectos de la enfermedad de Alzheimer, como el aumento en los niveles de colina y la formación de las placas amiloides (fibras $\alpha\beta$). Así, con el fin de conocer el sitio de unión de los ligandos cannabinoides que presentan actividad inhibitoria de la AChE y/o de la BuChE, se han realizado estudios de su cinética enzimática.

Los estudios cinéticos permiten reconocer si la inhibición de un compuesto se ejerce compitiendo con el sustrato natural, en este caso la acetilcolina, comportándose como un inhibidor competitivo, o por el contrario, no compete con el sustrato natural porque su sitio de acción es distinto al centro catalítico, permitiendo la unión de éste (inhibidores no competitivos). Dentro de los inhibidores no competitivos, también se encuentra el tipo de inhibición mixta, que generalmente se observa en compuestos que, pese a unirse a un lugar de la enzima distinto al centro catalítico, sí afectan de algún modo a la unión del sustrato natural, ya sea por la inducción de cambios conformacionales en el CAS, porque establezca interacciones con ciertos residuos del centro catalítico o por que ocasione algún impedimento estérico que dificulte esa unión.

Por ello, se ha llevado a cabo una evaluación del mecanismo de acción sobre ambas enzimas, AChE y BuChE, para los cannabinoides con un porcentaje significativo de inhibición (tabla 3), por medio de un análisis de su cinética¹²⁷⁻¹²⁹.

Las representaciones gráficas de Lineweaver-Burk obtenidas para la inhibición de la enzima AChE tanto para los cannabinoides estudiados como para el donepezilo¹²⁹, usado como compuesto de referencia, se muestran en la figura 13.

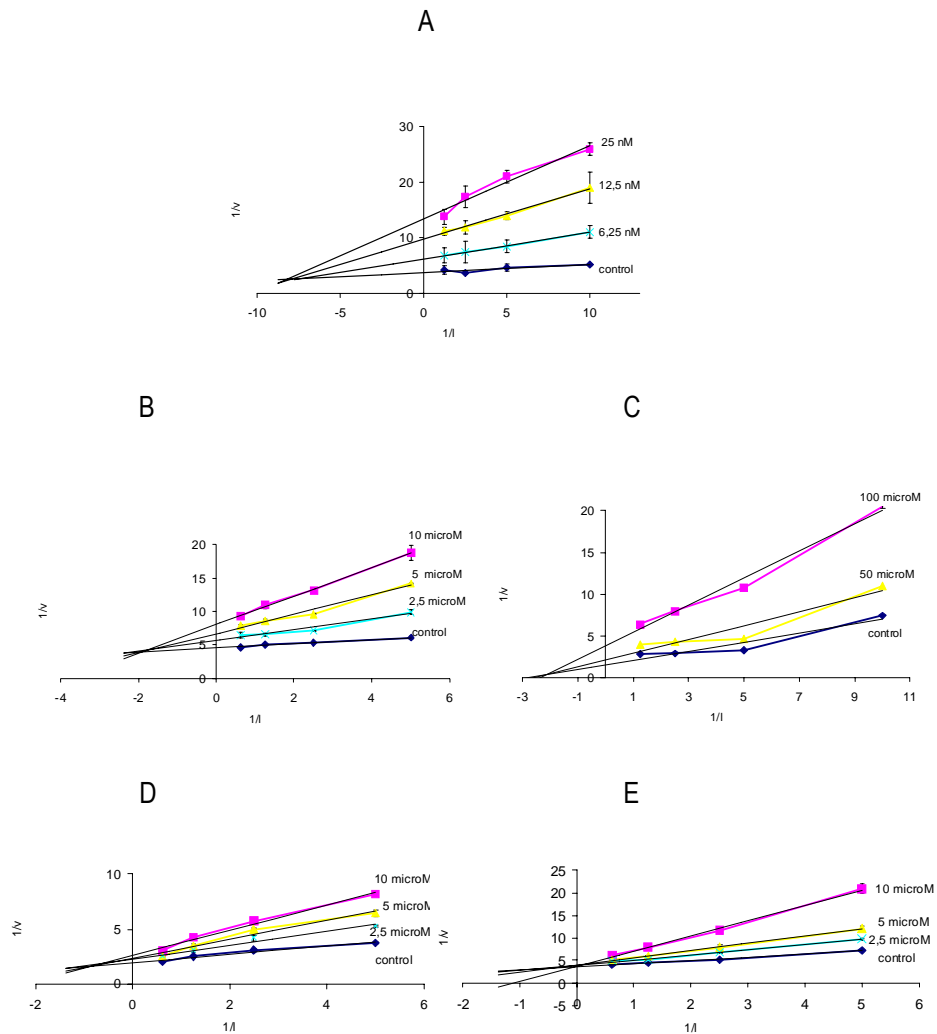


Figura 13. Representación gráfica de la inhibición de la AChE causada por donepezilo (A), Δ^9 -THC (B), CP-55,940 (C), JWH-133 (D) y JTE-907 (E). Actividad enzimática (v) expresada como $\text{min } \mu\text{M}^{-1}$.

La representación gráfica de la inhibición causada por el donepezilo, muestra un aumento tanto de la pendiente como de la intersección con en el eje X, al aumentar la concentración del inhibidor (Fig. 13A). Este comportamiento indica una inhibición de tipo mixto, en concordancia con los resultados descritos en la bibliografía¹²⁹.

Los cannabinoides analizados mediante estudios cinéticos fueron aquellos en los que fue posible determinar su IC_{50} (tabla 2), Δ^9 -THC, CP-55,940, JWH-133 y JTE-907. Como se puede observar en la figura 13, las gráficas A – E, muestran los tres patrones posibles de inhibición de la AChE. Así, se observa que los compuestos Δ^9 -THC y JWH-133 (Fig. 13B y 13D) mostraron gráficas similares a las obtenidas para el donepezilo (Fig. 13A), donde se refleja un tipo de inhibición mixto.

Por otra parte, la gráfica obtenida para el agonista inverso JTE-907 (Fig. 13E) no mostró una variación en la pendiente, pero sí un aumento en la ordenada en el origen con el aumento en las concentraciones de inhibidor, comportándose como un inhibidor competitivo puro de la AChE, lo que indica que este inhibidor compite con el sustrato natural (acetilcolina).

Finalmente, la gráfica obtenida para el compuesto CP-55,940 (Fig. 13C) no mostró ni variación en la pendiente, ni un aumento en la intersección de las mismas con el eje X, al aumentar las concentraciones del inhibidor, por lo que se comporta como un inhibidor no competitivo de la AChE, lo que sugiere que este cannabinoide se une al sitio periférico (PAS).

De una manera similar a la realizada para la enzima acetilcolinesterasa (AChE), se llevaron a cabo estudios de competición sobre la butirilcolinesterasa (BuChE), tanto con el donepezilo como con los cannabinoides que habían presentado un porcentaje significativo de inhibición sobre la BuChE humana (CP-55,940 y JWH-015) o equina (Δ^9 -THC, WIN55212-2 y L768242), para determinar su tipo de inhibición. Al analizar el perfil de las gráficas (Fig. 14), se puede llegar a la conclusión de que tanto el donepezilo como los cannabinoides Δ^9 -THC, WIN55212-2, JWH-015 y L768242 inhiben a la enzima BuChE de un modo mixto, mientras que el CP-55,940 (Fig. 14B) es un inhibidor no competitivo de la BuChE.

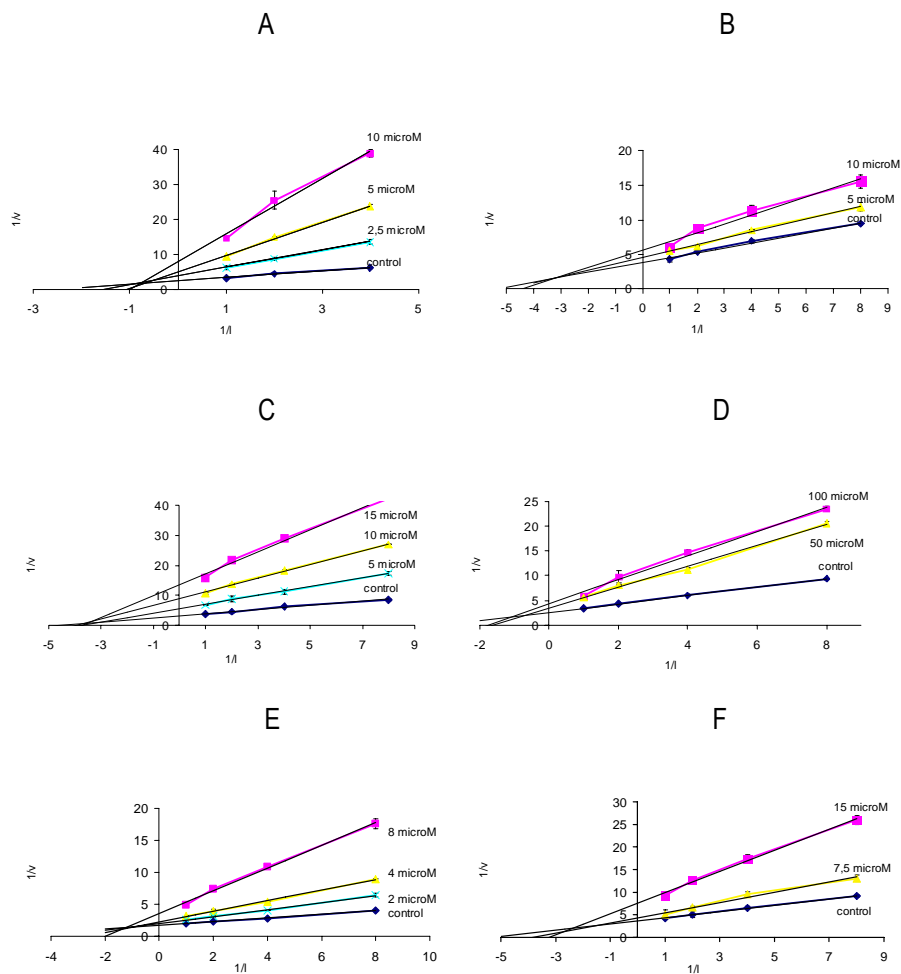


Figura 14. Representación gráfica de la inhibición de la BuChE causada por donepezilo (A), Δ^9 -THC (B), CP-55,940 (C), WIN55212-2 (D), JWH-015 (E) y L768242 (F). Actividad enzimática (v) expresada como $\text{min } \mu\text{M}^{-1}$.

La interpretación de los resultados obtenidos de los estudios de competición sobre la enzima BuChE, indican que todos los cannabinoides estudiados interaccionan en el centro periférico PAS, ejerciendo la mayoría de ellos una inhibición de tipo mixto, afectando de algún modo a la afinidad del sustrato natural por la enzima, salvo el compuesto CP-55,940, que se comporta como un inhibidor no competitivo puro. Los resultados obtenidos

en cuanto al tipo de inhibición ejercida sobre las enzimas colinesterasas AChE y BuChE están resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Modo de inhibición de los cannabinoides ensayados sobre las enzimas AChE y BuChE de suero humano.

Compuestos	AChE	BuChE
Δ^9-THC	Mixto	Mixto
CP-55,940	No Competitivo	No Competitivo
JWH-133	Mixto	ND ^a
WIN55212-2	ND	Mixto
JWH-015	ND	Mixto
L768242	ND	Mixto
JTE-907	Competitivo	ND
Donepezilo	Mixto	Mixto

^aNo Determinada.

3.3. ESTUDIO MEDIANTE MODELIZACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE LOS LIGANDOS CANNABINOIDES CON LAS ENZIMAS COLINESTERASAS AChE Y BuChE.

Con el objetivo de profundizar y complementar los estudios cinéticos, se analizó, mediante técnicas de anclaje (*docking*), la interacción de los agonistas cannabinoides que mostraron inhibición, tanto de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como de la butirilcolinesterasa (BuChE) (Tabla 3). El estudio de simulación de la formación de los complejos ligando-enzima se efectuó mediante el programa FlexiDock implementado en el paquete de programas Sybyl 7.2¹³⁰. Los estudios se realizaron con la estructura 3D tanto de la AChE (código PDB: 1B41¹³¹) como de la BuChE humana (código PDB: 1P0I¹³²). Se realizaron los estudios de *docking* de cada ligando con ambas enzimas, con el fin de conocer el posible modo de unión de los cannabinoides estudiados.

Como se ha comentado anteriormente, el sitio activo de ambas enzimas se subdivide en varios subsitios (Tabla 5): una tríada catalítica (CAS, Ser-His-Glu), situada en la base de la garganta, un subsitio aniónico (AS), un bolsillo de unión acilo (ABP) y un subsitio

periférico aniónico (PAS), situado en la desembocadura de la garganta. Las diferencias más importantes entre la AChE y la BuChE, respecto a los aminoácidos involucrados, se encuentran en el PAS y en el ABP. Por un lado, en la AChE, los residuos aromáticos Phe295 y Phe297, se encuentran cerca de la tríada catalítica mientras que en el caso de la BuChE, los residuos equivalentes a éstos son Leu286 y Val288. Por otro lado, la AChE posee además otro grupo de residuos aromáticos (Tyr72, Tyr124, Trp286 y Tyr337) formando un cuello de botella en la garganta de la enzima, lo que limita el acceso del sustrato al sitio activo, mientras que en la BuChE, este túnel hacia el centro activo está enmarcado por pequeños residuos, como Leu286, Val288 y Ala328.

Tabla 5. Relación de los aminoácidos involucrados en los Subsitios de la AChE y BuChE.

	Sitio periférico (PAS)	Bolsillo de unión acilo (ABP)	Agujero oxianiónico (OT)	Sitio aniónico (AS)	Triada catalítica (CAS)
AChE	Tyr72 Asp74 Tyr124 Ser125 Trp286 Tyr337 Tyr341	Phe295 Phe297 Trp236 Phe338	Gly121 Gly122 Ala204	Trp86 Tyr133 Glu202 Gly448 Ile451	Ser203 His447 Glu334
BuChE	Asn68 Asp70 Gln119 Thr120 Ala328 Tyr332	Leu286 Val288 Trp231 Phe329	Gly116 Gly117 Ala199	Trp82 Tyr128 Glu197 Met437 Tyr440	Ser198 His438 Glu325

Con el objeto de validar la metodología empleada en los estudios de *docking*, en una primera fase se analizaron computacionalmente, los complejos de AChE con los inhibidores más conocidos como el donepezilo (tipo de inhibición mixta)¹²⁹, propidio (tipo de inhibición no competitiva)¹²⁹ y edrefonio (tipo de inhibición competitiva pura)¹²⁹. Los residuos implicados en las interacciones con los ligandos seleccionados y las interacciones encontradas se recogen en la parte experimental (sección 10.3). Cabe

mencionar que el sitio de unión obtenido para los tres complejos de entrada está perfectamente de acuerdo con los datos experimentales sobre el tipo de inhibición¹²⁹.

Los resultados de *docking* para estos tres complejos, nos permiten deducir los residuos clave en la interacción. De esta forma, se observa que el donepezilo se une a la AChE humana a lo largo del túnel entre el PAS y el CAS, siendo clave el grupo formado por los residuos aromáticos Trp86, Tyr124, Trp286, Phe295, Tyr337 y Tyr341. El propidio en cambio, sólo muestra interacciones con los residuos del PAS, Trp286, Tyr72 y Tyr341. Y por último, el edrofonio, mediante una interacción π -catión, interacciona con el Trp86, permitiendo la interacción con los residuos del sitio CAS, His447 y Ser203.

Los resultados obtenidos de estos estudios son concordantes con los datos experimentales, lo que valida la metodología utilizada. Por tanto, se procedió al estudio de los acoplamientos de los cannabinoides seleccionados con las dos enzimas, la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE).

Los estudios de *docking* en la AChE que se llevaron a cabo con los ligandos cannabinoides Δ^9 -THC, JWH-133, JTE-907 y CP-55,940 (Fig. 15), muestran diferentes modos de unión, incluso entre los derivados tricíclicos, estructuralmente análogos al Δ^9 -THC.

La conformación más estable generada con los estudios de *docking* para los cannabinoides Δ^9 -THC, CP-55,940 y JWH-133, muestran que estos ligandos se aproximan a la enzima AChE por la cadena alquílica en la posición C-3, presentando interacciones del anillo aromático con los residuos del sitio periférico (PAS) (Fig. 15). Estos estudios muestran un diferente modo de unión de los ligandos JWH-133 y Δ^9 -THC, frente al CP-55,940, lo que concuerda con los resultados obtenidos experimentalmente, donde los dos primeros son inhibidores de la AChE de tipo mixto, mientras que el último es un inhibidor no competitivo.

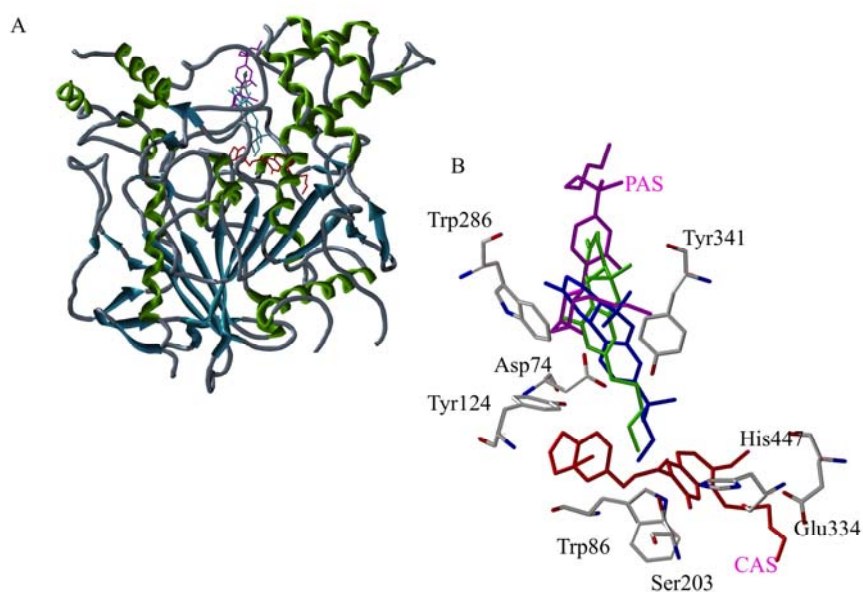


Figura 15. A) Superposición estructural de los ligandos Δ^9 -THC (verde), CP-55,940 (morado), JTE-907 (rojo), y JWH-133 (azul) en la enzima AChE. B) Ampliación esquemática del sitio de unión de la AChE.

Los resultados de los estudios de *docking* (tabla 6) permiten observar que tanto el fitocannabinoide Δ^9 -THC como el JWH-133 adoptan una disposición a lo largo de la garganta catalítica que faculta la unión del ligando y de la acetilcolina al mismo tiempo, en concordancia con los resultados experimentales de los estudios cinéticos (Fig. 13). Esta orientación, que permite al ligando alcanzar la tríada catalítica, está estabilizada por las interacciones con los residuos del centro periférico (PAS). Como ejemplo tomemos el ligando Δ^9 -THC, que interacciona, por un lado, con el Asp74 mediante un enlace de hidrógeno (EH) a través del grupo OH del anillo fenólico y, por otro, mediante interacciones aromáticas de ese mismo anillo con Tyr124, Trp286 y Tyr341, así como con los residuos Gly121 y Phe338 mediante interacciones de van der Waals y CH- π con la cadena de pentilo, respectivamente. Todo ello permite que este ligando alcance el subsitio aniónico (Trp86) (Fig. 16).

Tabla 6. Listado de las principales interacciones entre la enzima AChE y los ligandos cannabinoides Δ^9 -THC, CP-55,940, JTE-907, y JWH-133.

COMPUESTO	SITIO PERIFERICO (PAS)	GARGANTA CATALITICA	SITIO ANIONICO (AS)	CENTRO ACTIVO (CAS)
Δ^9-THC	Asp74 (EH, OD1Asp-OH _{fenólico}) Trp286 (EH, NE1Trp-OH _{fenólico}) $(\pi$ - π paralela, Trp-anillo fenólico) (CH- π , Trp-CH-anillo tetrahidropirazol) Tyr341 $(\pi$ - π paralela, Tyr-anillo fenólico) Tyr124 $(\pi$ - π desplazada, Tyr-anillo fenólico)	Phe338 (CH- π , Phe-CH _{pentanil}) Gly121 (Ph, anillo fenólico)	Trp86 (Ph, anillo fenólico)	
CP-55,940	Trp286 (EH, OTyr-OH _{hidroxipropil}) $(\pi$ - π desplazada, Trp-anillo fenólico) (CH- π , Trp-CH(CH ₃) _{2heptanil}) Tyr341 $(\pi$ - π desplazada, Tyr-anillo fenólico) Tyr124 (Ph, (CH ₃) _{2heptanil})	Phe338 (Ph, (CH ₃) _{2heptanil})		
JWH-133	Trp286 (CH- π , Trp-CH _{Ciclohexeno}) Tyr341 $(\pi$ - π paralela, Tyr-anillo fenólico) Tyr124 (OH- π , OH Tyr-anillo fenólico)	Phe338 (CH- π , Phe-CH _{butil}) Gly121 (Ph, anillo fenólico)	Trp86 (Ph, anillo fenólico)	
JTE-907	Trp286 $(\pi$ - π , Tyr-anillo fusionado) Tyr341 $(\pi$ - π , Tyr-anillo fusionado) Tyr337 $(\pi$ - π , Tyr-benzodioxo)	Phe338 $(\pi$ - π , Phe- benzodioxo)	Trp86 $(\pi$ - π , Trp-benzodioxo)	Ser203 (EH, OGSer-O _{Benzodioxo}) His447 (Ph, benzodioxo) Glu334 (Ph, benzodioxo)

EH: Enlace de hidrógeno; Ph: Interacción hidrófoba.

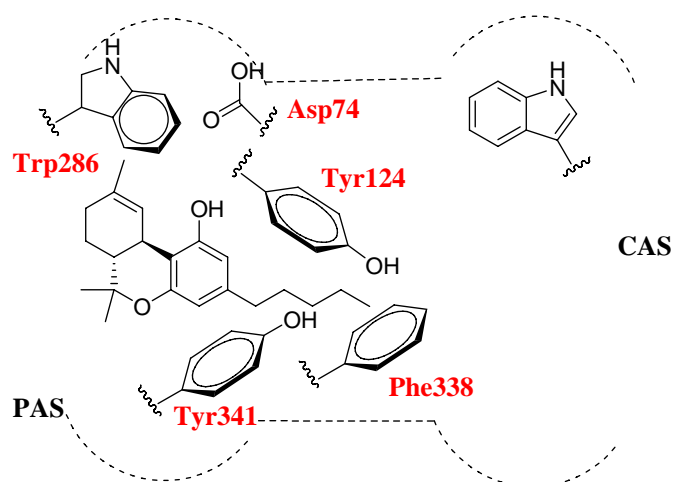


Figura 16. Representación esquemática de las interacciones más relevantes del ligando Δ^9 -THC con la AChE.

Mientras, el ligando CP-55,940, inhibidor no competitivo, se sitúa en el sitio PAS, anclándose en la AChE mediante un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxipropilo y el oxígeno carbonílico del residuo Trp286 e interacciones π - π con los residuos Trp286 y Tyr341. Debido al tamaño de la garganta catalítica, la conformación bioactiva de este compuesto se acopla en el sitio PAS ya que el movimiento hacia el sitio aniónico (AS) está impedido estéricamente (Fig. 17).

Por otra parte, el agonista inverso JTE-907, un inhibidor competitivo que actúa a través del centro activo CAS, adopta una conformación que no permite la unión del sustrato natural. Este cannabinoide bloquea el acceso del sustrato al centro activo (CAS) de la AChE, mediante las interacciones del anillo aromático del 1,3-benzodioxol con los residuos Ser203 y Trp86, a través de un enlace de hidrógeno e interacciones π - π , respectivamente (Fig. 18).

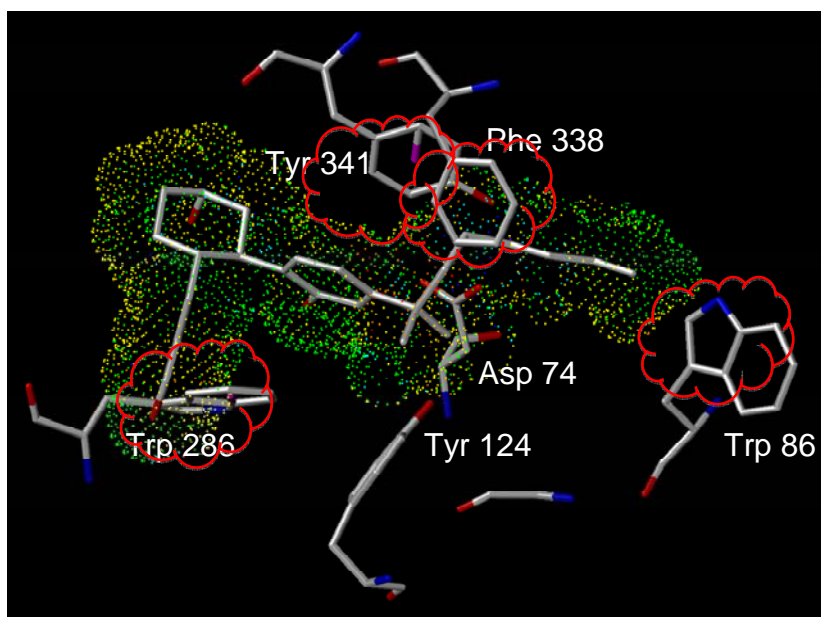


Figura 17. Representación esquemática de la orientación del ligando CP-55,940 en el centro PAS de la AChE, donde se aprecia el impedimento estérico para su acceso al CAS.

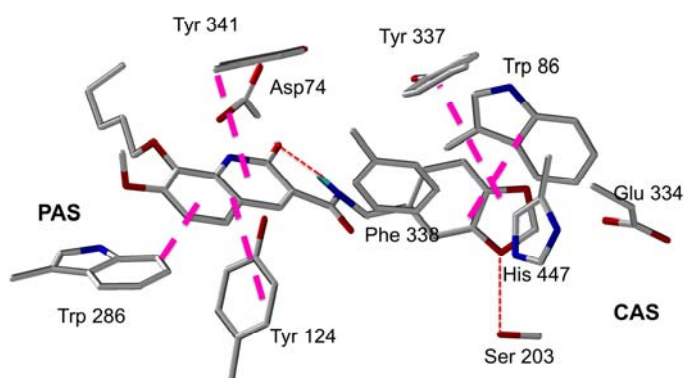


Figura 18. Representación esquemática de las interacciones del cannabinoide JTE-907 y la enzima AChE.

Debido a la formación del enlace intramolecular entre el NH de la agrupación amídica y el oxígeno exocíclico (Fig. 18), la conformación en el JTE-907 es extendida, mientras que el resto de compuestos (Δ^9 -THC, JWH-133 y CP-55,940) tienen una conformación más “globular”, lo que hace que su superficie sea mayor y que, por tanto, debido al impedimento estérico, no sea posible su paso a través del cluster aromático que forman tanto el sitio periférico como la garganta catalítica.

De manera análoga a los estudios de *docking* realizados en la AChE, se han llevado a cabo los correspondientes estudios de los complejos formados entre la BuChE humana y los cannabinoides que mostraron cierta inhibición (Tabla 3), cuyos resultados más relevantes se encuentran recogidos en la tabla 7.

Como se comentó al principio de este capítulo, la enzima acetilcolinesterasa (AChE) posee un grupo de residuos aromáticos (Tyr72, Tyr124, Trp286 y Tyr337) en forma de cuello de botella que se encuentran en la garganta de la enzima, mientras que en la butirilcolinesterasa (BuChE), este túnel hacia el centro activo está enmarcado por pequeños residuos, como Leu286, Val288 y Ala328 y por lo tanto hay más espacio.

Como consecuencia de ello, los cannabinoides inhibidores de la AChE quedan anclados mediante las interacciones aromáticas con los residuos de la garganta mientras en la BuChE, al no existir estos residuos, los ligandos tienen una mayor movilidad, provocando que estos complejos no sean tan favorables como con la AChE.

Esta ausencia del *cluster* aromático en la enzima BuChE, podría explicar la menor capacidad inhibitoria de los cannabinoides Δ^9 -THC, JWH-133 y JTE-907 respecto a su inhibición exhibida sobre la AChE, al existir un menor número de interacciones en el complejo. Así, de entre los cannabinoides estudiados, únicamente los ligandos JWH-015, CP-55,940, L768242 y, en menor medida el WIN55212-2, muestran actividad inhibitoria significativa sobre la enzima BuChE.

Tabla 7. Listado de las principales interacciones entre la enzima BuChE y los ligandos cannabinoides con efecto inhibitorio sobre BuChE.

COMPUESTO	SITIO PERIFERICO (PAS)	GARGANTA CATALITICA	SITIO ANIONICO (AS)	CENTRO ACTIVO (CAS)
Δ^9-THC	Asp70 (EH, OH anilloA-OD2) Thr120 (Ph) Ser72 (EH, OH anillo A-OG) Tyr 332 (π - π , anillo indol)	Phe329 (Ph) Gly116 (Ph) Gly117 (Ph)		
CP-55,940	Thr120 (Ph) Asp 70 (Ph) Asp 70 (EH, O-alkyl) Gln119 (Ph) Tyr 332 (π -CH)	Phe 329 (π - π)		
JWH-133	Asp70 (Ph) Thr120 (Ph) Tyr332 (π - π , anillo indol) Ser72 (Ph)	Phe329 (Ph) Gly116 (Ph) Gly117 (Ph)		
WIN55212-2	Asp70 (Ph) Gln119 (Ph) Tyr332 (EH, OH-O30)	Trp231 (π - π , naftilo) Phe329 (π - π , naftilo) Gly 117 (EH, O-CO)	Trp82 (π - π , anillo indol)	Ser198 (EH, OG-CO) His438 (π - π)
JWH-015	Asp70 (Ph) Thr120 (Ph) Trp332 (π - π naftilo)	Phe329 (π - π , naftilo) Gly116 (Ph) Gly117 (EH, N-O=C)	Trp82 (π - π , anillo indol)	Ser198 (EH, OG-O23) His438 (π -N ⁺)
L768242	Asp70 (Ph), Thr120 (Ph) Trp332 (π - π , morfolina)	Phe329 (π - π , morfolina)	Trp82 (π - π , anillo indol)	His438 (π - π , anillo indol)

EH: Enlace de hidrógeno; Ph: Interacción hidrófoba.

En el caso del CP-55,940, la interacción en el sitio periférico de la BuChE es más estable, ya que al ser su garganta más grande que en el caso de la AChE, el ligando se puede colocar mejor y verse así favorecidas las interacciones aromáticas π - π paralelas con los residuos Phe329 y Tyr332. (Fig. 19). Estos resultados están en concordancia con los datos experimentales de inhibición, y explican los resultados experimentales obtenidos en los estudios cinéticos, donde el CP-55,940 se comportaba como un inhibidor no competitivo.

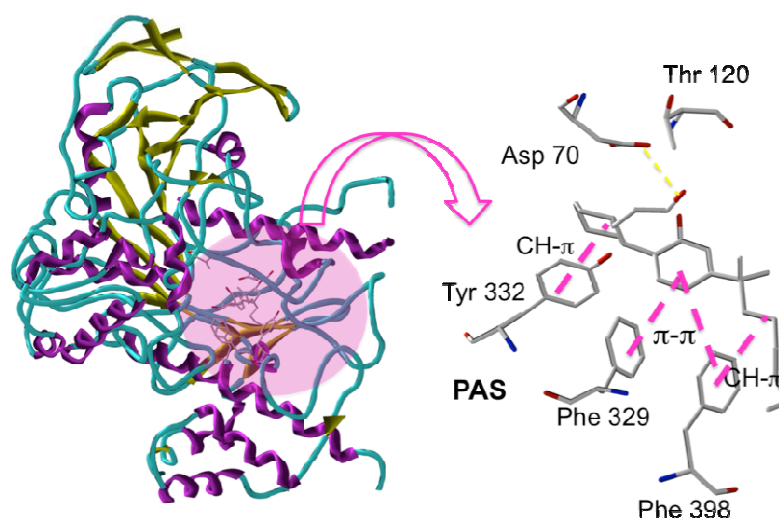


Figura. 19. Esquema de la interacción del cannabinoide CP-55,940 en el sitio PAS de la BuChE.

En el caso de los indoles como el JWH-015, WIN55212-2 y L768242, la unión se produce a lo largo del túnel entre PAS y CAS, mediante interacciones aromáticas con los residuos Tyr332, Phe329 y Trp82. Hay que destacar que en el caso de los aminoalquilindoles, se favorece una interacción π -catión con el residuo Trp82 de la BuChE, gracias al anillo de indol, lo que ayuda a anclar al cannabinoide en una posición que le permite interaccionar con ciertos residuos del centro catalítico (Fig. 20), explicando los datos experimentales obtenidos en los estudios cinéticos, donde el grupo de los aminoalquilindoles muestra una inhibición de tipo mixta (Tabla 4).

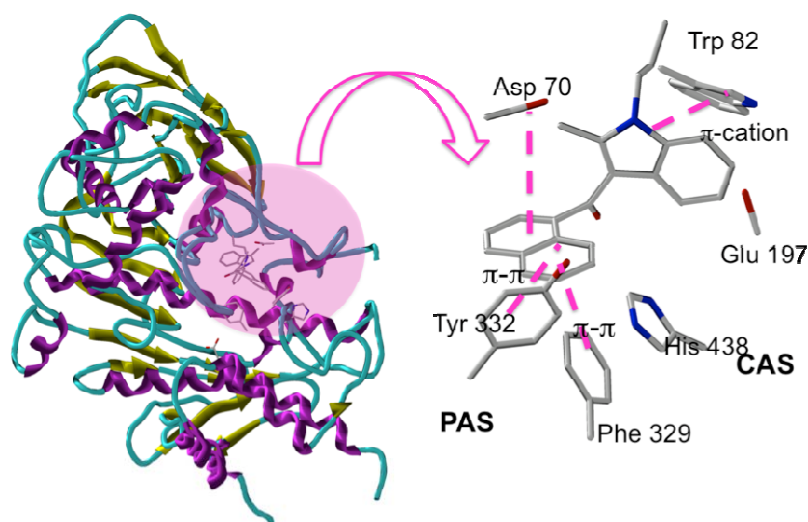


Figura 20. Esquema de la interacción del cannabinoide JWH-015 en la enzima BuChE.

3.4. CONCLUSIONES.

Como conclusión, se puede decir que los estudios de inhibición realizados en este trabajo, han demostrado que algunos de los agonistas cannabinoides estudiados son inhibidores de la AChE y/o BuChE, con valores de IC_{50} comparables a los de la rivastigmina.

Mediante los resultados experimentales de cinética y el análisis de los estudios computacionales se ha podido esclarecer y el sitio de unión y por tanto el modo de acción de los cannabinoides inhibidores de la AChE/BuChE. En general, los cannabinoides estudiados mostraron un modo de inhibición tipo mixto frente a la AChE/BuChE, de forma análoga a la mostrada por el donepezilo. En concordancia con estos resultados, los estudios de anclaje indican su interacción en el centro periférico (PAS), además de la existencia de interacciones con algunos residuos del centro catalítico, causando también un impedimento estérico que dificulta el acceso a ese centro catalítico, lo que, aún

permitiendo la llegada del sustrato natural al centro activo CAS, provoca una disminución de su afinidad,

Las excepciones a este comportamiento se encontraron para el agonista de la CP-55,940, que mostró una inhibición no competitiva sobre ambas enzimas, lo que sugiere que este cannabinoide sólo se une a la zona periférica (PAS), como demuestran los estudios teóricos descritos, y para el agonista inverso JTE-907, que se comporta como inhibidor competitivo selectivo de la AChE, de acuerdo con las interacciones que presenta con los residuos Ser203 e His447 del centro activo CAS, posiblemente debida a la diferente conformación bioactiva que adquiere la molécula respecto al resto de compuestos estudiados.

4. DISEÑO DE CANNABINOIDES MULTIDIANA DERIVADOS DE ÉTERES DE INDAZOL

4.1. ANTECEDENTES. MODELOS TRIDIMENSIONALES DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES.

4.2. MODELIZACIÓN DEL RECEPTOR CB2.

4.3. DISEÑO DE NUEVOS CANNABINOIDES DERIVADOS DE INDAZOL.

Las etapas de diseño y optimización son dos procesos claves en el desarrollo de un fármaco. Estas etapas se pueden abordar mediante dos estrategias diferentes y complementarias, bien en base a la estructura de los ligandos, conocido como “diseño indirecto” o bien conociendo la estructura tridimensional del receptor mediante “diseño directo”.

En general, los fármacos presentan especificidad estructural, es decir, ejercen su efecto mediante la interacción con alguna macromolécula biológica. Conocida la diana terapéutica involucrada en el proceso biológico que se estudia, ya sea de forma teórica o experimental, es posible abordar el diseño de nuevos fármacos que puedan ejercer su efecto en dicha diana.

Predecir cómo se unirá un nuevo ligando a la proteína de interés, no es en ningún caso una tarea trivial ni de libre subjetividad. El problema se puede abordar mediante la aplicación de diferentes metodologías, dependiendo de la información experimental de la que se dispone. Si la proteína es relativamente fácil de cristalizar, y sobre todo si tiene un alto interés farmacológico, en un gran número de casos existen complejos cristalizados ligando-receptor. En estos sistemas se puede disponer de información privilegiada, como la de la posición relativa de distintos ligandos en el sitio activo de la proteína, o datos de biología molecular. Quedará entonces por deducir el modo de unión de nuevos ligandos y proponer un modelo de acoplamiento entre dichas moléculas y la proteína de estudio, con la ayuda de programas de modelización molecular.

Las **técnicas de docking** evalúan la actividad potencial de una quimioteca de compuestos, posicionada en el sitio de unión del receptor, a partir de la interacción proteína-ligando. Asimismo, dichas técnicas permiten la identificación del modo de unión, es decir, la orientación y conformación que el ligando adopta en la cavidad de la proteína, y, menos frecuentemente, se utilizan para identificar el sitio de unión (*blind docking*)¹³³⁻¹³⁵.

Un protocolo de *docking* se caracteriza tradicionalmente por dos aspectos: el *docking* o método seguido para muestrear el espacio conformacional del complejo ligando-receptor,

y la función de *scoring*, utilizada para evaluar la afinidad de la interacción ligando-macromolécula^{136, 137}.

Los programas de *docking* son métodos automáticos útiles para explorar los posibles modos de unión de los ligandos a la proteína de estudio. Estos programas realizan una exploración exhaustiva de las posiciones relativas ligando-proteína, evaluando las interacciones intermoleculares en cada posición explorada. Como resultado de esta exploración se obtiene una relación de posibles disposiciones de acoplamiento ligando-proteína, que el programa ordena según el valor que su función de evaluación le ha dado a cada solución. Para realizar estudios de *docking* es necesario conocer la estructura 3D del receptor, ya sea de forma experimental (Rayos X, RMN) o teórica (modelización por homología).

4.1. ANTECEDENTES. MODELOS TRIDIMENSIONALES DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES.

Los receptores cannabinoides, se encuentran dentro del grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, *G Protein-Coupled Receptors*), también denominados receptores transmembranales o 7TM. Estos receptores son proteínas que comparten una topología común compuesta por siete hélices alfa transmembranales hidrófobas (Fig. 21). El extremo *N*-terminal se localiza en la cara extracelular de la membrana y está a menudo glicosilado, mientras que el extremo *C*-terminal, situado en la zona citoplasmática, se encuentra generalmente fosforilado. Tres *loops* extracelulares se alternan con tres *loops* intracelulares para unir las siete regiones transmembrana. Las partes más conservadas de estas proteínas son las regiones transmembrana y los dos primeros *loops* citoplasmáticos. Suele conservarse el motivo x-Arg-y, donde x es un residuo ácido e y un residuo aromático, en el extremo *N*-terminal del segundo *loop* citoplasmático, el cuál puede estar implicado en la interacción con las proteínas G^{138, 139}.

En humanos, los receptores CB1 y CB2 comparten aproximadamente un 44% de identidad en su secuencia de aminoácidos, porcentaje que aumenta hasta el 68% cuando se comparan únicamente los segmentos transmembranales¹⁴⁰.

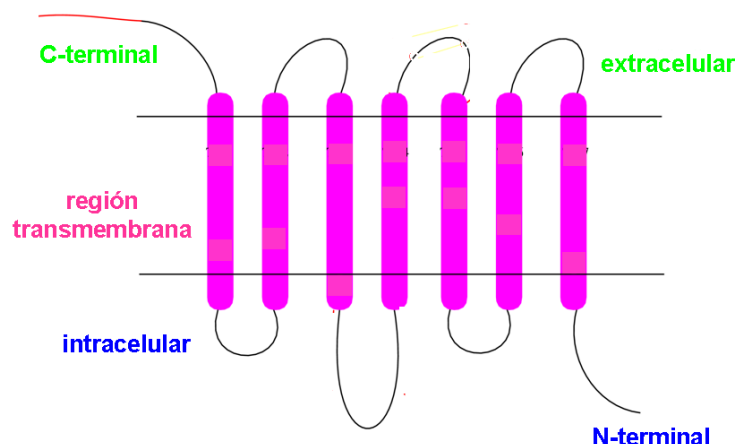


Figura 21. Esquema representativo de la topología de los receptores cannabinoides.

La estructura tridimensional de los receptores cannabinoides, como la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, no está determinada experimentalmente, excepto en el caso de la *Rodopsina bovina*^{141, 142}, la opsina,^{143, 144} el receptor β -adrenérgico^{145, 146} y el receptor de adenosina¹⁴⁷. Como consecuencia de este hecho, se han aplicado diferentes metodologías computacionales para la obtención de modelos 3D de los receptores cannabinoides¹⁴⁸⁻¹⁵³. El primer modelo del receptor CB1 se estableció utilizando la transformada de Fourier en el análisis de la periodicidad α -helicoidal de las secuencias de los receptores CB1 y una serie de homólogos GPCR^{152, 154, 155}. Posteriormente, Mahmoudian *et. al.*¹⁵⁶ desarrollaron otro modelo CB1 basado en la estructura de la bacteriorodopsina, aunque este receptor no es un GPCR propiamente dicho¹⁵⁷. La obtención en el 2002 por el grupo de Palczewsky¹⁴¹ de la estructura 3D de la *rodopsina bovina* mediante cristalografía de Rayos X, representó un hito clave para la determinación teórica de modelos tridimensionales más precisos y fiables. Desde la publicación de la estructura de la *rodopsina*, varios modelos de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) en sus formas activas y/o inactivas han sido desarrollados mediante modelización por

homología y dinámica molecular utilizando como plantillas las diferentes estructuras tridimensionales existentes^{74, 148, 149, 151, 153, 158-164}. Modelos más recientes de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, publicados por Maccarrone *et. al.*¹⁶⁵, han sido desarrollados utilizando como plantilla la estructura cristalina del receptor β -adrenérgico^{145, 146, 166}.

Los receptores cannabinoides, como todos los GPCRs, cambian su conformación de un estado inactivo (R) a un estado activo (R*) en respuesta a la unión de agonistas. Hay dos hipótesis propuestas que intentan explicar estos cambios conformacionales: la hipótesis conocida como selección conformacional y la inducida por ligando^{167, 168}. La primera hipótesis propone la existencia de dos conformaciones en equilibrio, el cual es desplazado hacia la forma activa por la unión de un agonista, que preferentemente se une a dicha forma. Mientras, la segunda hipótesis propone que la unión de un agonista a la forma inactiva induce la transición de la esta forma a la forma activa.

La determinación estructural de la forma activa de la opsina^{143, 144} y del receptor β 2-adrenérgico¹⁶⁹ han arrojado algo más de información sobre la posible activación de las GPCRs. La característica común de estas estructuras es la falta del puente salino entre un residuo de Arg en la hélice TM3 y un residuo de Glu en la hélice TM6 (motivo “*ion lock*”) debido al movimiento de la hélice TM6.

Gracias a los esfuerzos computacionales (modelos por homología y estudios de acoplamiento), junto con los estudios de mutagénesis, ha sido posible identificar algunos de los residuos más importantes que intervienen en los sitios de unión de los receptores cannabinoides y proponer el modo de unión de ligandos tanto agonistas^{153, 160-162} como antagonistas^{149, 151, 153, 162, 164, 170}.

Así, en la figura 22, se muestran los residuos más importantes de la zona de unión del receptor cannabinoide CB2 con el agonista WIN55212-2. Se muestran tanto las interacciones propuestas por diferentes autores mediante estudios computacionales como aquellos residuos determinados mediante estudios de mutagénesis que están involucrados en la unión a los agonistas¹⁷¹. Las interacciones aromáticas están

representadas en zig-zag, mientras que la curva discontinua representa las interacciones hidrófobas. En rojo, residuos considerados clave para la unión mediante estudios de mutagénesis.

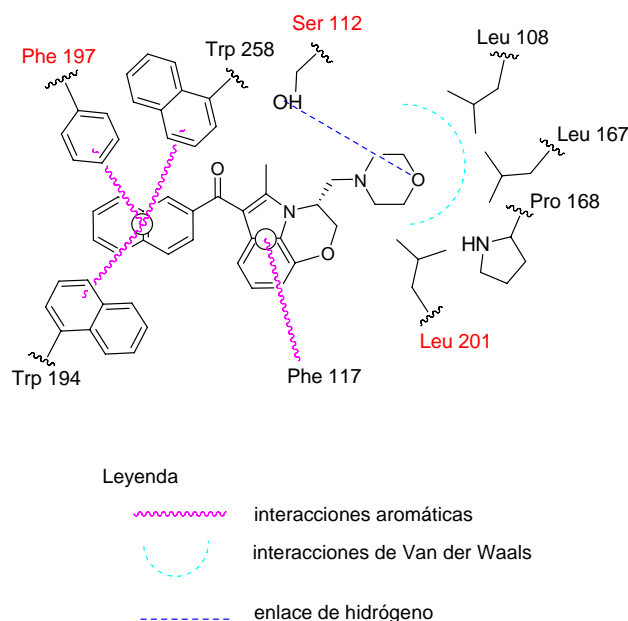


Figura 22. Representación esquemática del sitio de unión del WIN55212-2 en el receptor CB2 según diferentes autores. En rojo los residuos estudiados por mutagénesis.

4.2. MODELIZACIÓN DEL RECEPTOR CB2.

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado intensamente en este campo y se han propuesto modelos tridimensionales para dichos receptores tanto en su forma inactiva¹⁵¹ como en su forma activa (resultados sin publicar). El establecimiento de los modelos tridimensionales de ambos receptores cannabinoides, se abordó mediante modelización por homología, utilizando la estructura de rayos X de la *Rodopsina bovina* en su forma inactiva (Código pdb: 1F88), como patrón estructural. Con el fin de estudiar la robustez del modelo se realizaron estudios de anclaje con ligandos cannabinoides de naturaleza antagonista (SR141716, AM-630 y SR144528). Los resultados obtenidos de

estos estudios estaban en concordancia con los datos experimentales de mutagénesis¹⁷¹, donde se ponía de manifiesto la importancia de ciertos residuos (Lys122, Ser161, Ser165, Val164, Trp172, Phe197, Trp209) en la unión de los receptores cannabinoides con los antagonistas.

Partiendo de nuestro modelo 3D del receptor CB2 en su forma inactiva, se procedió a la modelización del receptor CB2 en la correspondiente forma activa, teniendo en cuenta dos aspectos claves en el proceso de activación. El primero, considerar los cambios estructurales que sufre el receptor CB2 en el proceso de activación, como es el reordenamiento de las hélices TM3 y TM6 y la desaparición del enlace iónico entre los residuos Arg131 (R3.50) y Asp240 (D6.30)^{172,173}. El segundo aspecto a considerar, teniendo en cuenta los estudios de mutagénesis, son los residuos que están involucrados en la unión del WIN55212-2¹⁷¹ al receptor CB2, tales como la Ser112, el Trp158, el Trp172 y el Phe197, entre otros.

Por otra parte, como se ha comentado en la introducción de este capítulo, durante el desarrollo de esta memoria, nuevas estructuras GPCRs han sido resueltas mediante difracción de rayos X. Las que merecen mayor atención son las estructuras de la rodopsina en su forma activa (opsina) y del receptor β 2-adrenérgico formando un complejo con un agonista inverso. La estructura de la opsina¹⁷⁴ (código PDB: 3CAP) presenta importantes cambios estructurales frente a la estructura de la rodopsina bovina, siendo los más importantes la falta del puente salino entre los residuos Arg131-Asp240, el alejamiento (6-7 Å) de la hélice TM6 y la elongación de la hélice TM5. Estos cambios asociados con el estado activo de las GPCRs, reorganizan el sitio activo revelando dos aperturas que pueden servir de entrada y salida de los ligandos. En el caso del receptor β 2-adrenérgico¹⁶⁹ (código PDB: 3D4S), comentar que ha sido cristalizado con timolol, un agonista inverso. No está claro si la estructura de este receptor se encuentra en una conformación activa¹⁷⁵, sin embargo hay varios hechos que apuntan a la bondad de este receptor como posible patrón para la modelización de CB2. Por un lado, el receptor adrenérgico no presenta tampoco el puente salino característico del estado inactivo y por otro, el *loop* extracelular E2, entre las hélices TM4 y TM5, deja espacio para que el sitio de

unión sea accesible a los ligandos, mientras que en la estructura de la rodopsina este *loop* está plegado, cerrando la entrada al sitio activo.

Todo ello, unido a nuevas aportaciones de nuestro grupo de investigación sobre la influencia del entorno de la bicapa lipídica sobre los receptores cannabinoides¹⁷⁶, dio lugar a sucesivas mejoras del modelo del receptor cannabinoide CB2, que se fueron utilizando para la predicción de la afinidad de los éteres de indazol propuestos.

Con objeto de validar el nuevo modelo de CB2 se realizaron estudios de *docking* con los agonistas cannabinoides WIN55212-2 y JWH-015. En el caso del complejo CB2R*-WIN55212-2, el sitio de unión del nuevo modelo del receptor CB2 está en concordancia con los estudios de mutagénesis dirigida descritos¹⁷¹. Asimismo, el modo de unión obtenido para el complejo CB2R*-JWH-015, se asemeja a estudios computacionales realizados previamente por otros grupos de investigación^{159, 171}.

Para facilitar el análisis de las principales interacciones y teniendo en cuenta la analogía estructural del aminoalquilindol JWH-015 con los indazoles propuestos, nos vamos a centrar en las interacciones claves encontradas entre este compuesto y el receptor CB2 (Fig. 23). Como se observa en esta figura, se establecen interacciones aromáticas del tipo π - π con los residuos aromáticos Phe197 y Trp258 tanto con el anillo de indol como con el sustituyente naftilo, así como enlaces de hidrógeno entre el grupo carbonilo del ligando JWH-015 y los grupos OH del residuo de Thr114 y SH de la Ser165. Asimismo, con los residuos Leu201 y Val164, se generan interacciones de van der Waals en la región del morfolinoetilo. Además de estas interacciones, mencionar las interacciones entre los anillos aromáticos (naftilo e indol) del JWH-015 con el átomo de azufre de los residuos Met115 y Met265.

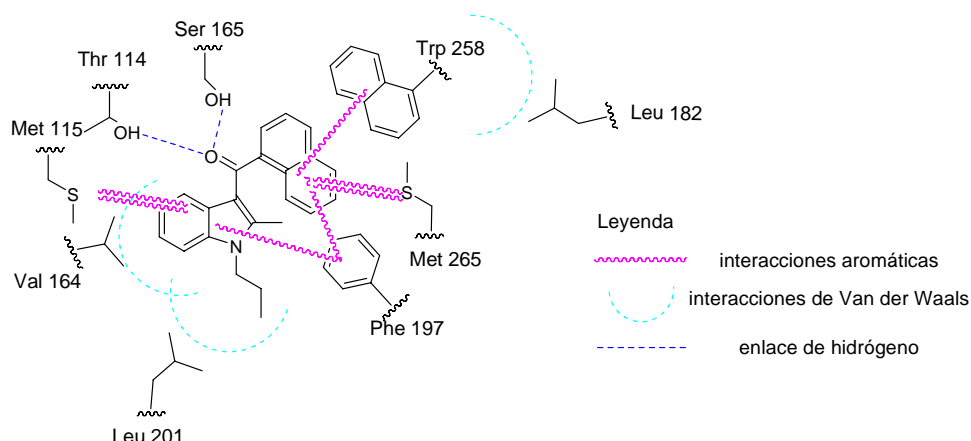


Figura 23. Esquema del centro activo de CB2R* con el ligando JWH-015.

Dado que nuestro nuevo modelo presenta estructuralmente los rasgos de una conformación activa y que los estudios de *docking* con los ligandos cannabinoides WIN55212-2 y JWH-015 fueron compatibles con los datos de mutagénesis dirigida existentes, siendo además concordantes con modelos referidos por otros autores, se puede considerar que, en términos generales, el modelo construido puede ser aplicado en un cribado virtual con el fin de detectar compuestos agonistas CB2.

4.3. DISEÑO DE NUEVOS CANNABINOIDES DERIVADOS DE INDAZOL.

El trabajo desarrollado en esta memoria ha seguido la metodología propia de la investigación en Química Médica que consiste en el diseño, síntesis, evaluación biológica y optimización.

En la etapa del diseño se han utilizado métodos quimioinformáticos, que incluyen modelización por homología y estudios de *docking*, combinados con métodos más clásicos de analogía molecular, en la selección de las moléculas de estudio.

El objetivo fundamental de la presente memoria que consiste en el desarrollo de cannabinoides multidiana, se ha abordado mediante un proceso iterativo que consta de los siguientes pasos: i) diseño inicial mediante *docking*; ii) síntesis y evaluación

farmacológica iii) refinamiento de los modelos teóricos (optimización), iv) síntesis y evaluación de nuevas moléculas (Fig. 24).

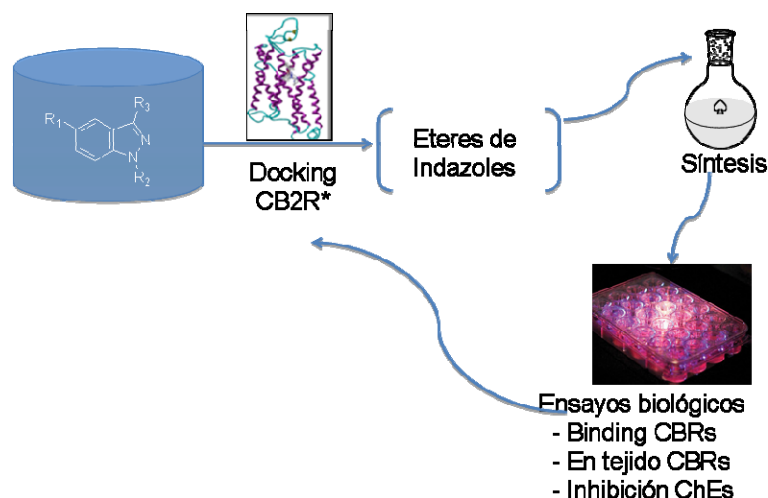


Figura 24. Representación esquemática del proceso de investigación para el desarrollo de agonistas cannabinoides inhibidores de colinesterasas.

La metodología utilizada para el diseño de nuevos cannabinoides se basa, por una parte, en la analogía tridimensional de los posibles mínimos conformacionales de los éteres de indazol, con los correspondientes aminoalquilindoles, de tal manera que los sustituyentes en la posición 1 y el grupo aromático unido al oxígeno de la posición 3, pueden, en principio, ocupar regiones espaciales similares en el receptor CB2 (Fig. 25).

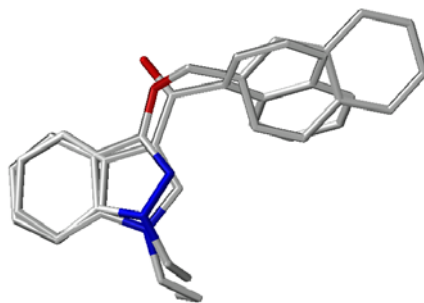


Figura 25. Superposición estructural de un AAI y un éter de indazol.

Por otra parte, conociendo el centro activo del receptor cannabinoide CB2 y por tanto los aminoácidos implicados (Thr114, Met115, Val164, Phe197, Leu201, Trp258 y Met265) es razonable la hipótesis de que es posible la interacción de un derivado de éter de indazol si los sustituyentes, en las posiciones N-1 y en el oxígeno unido a la posición 3, son adecuados (Fig. 26).

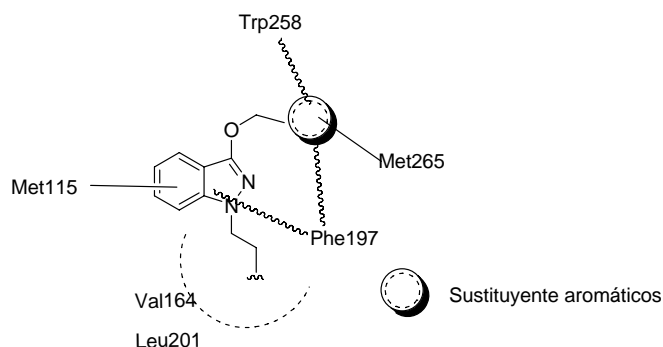


Figura 26. Posibles interacciones con los ligandos del centro activo del receptor CB2.

Cribado virtual mediante estudios de docking.

Es evidente que el número de derivados posibles resultante de la modificación de los sustituyentes del sistema de indazol en las diferentes posiciones es muy elevado, mientras que los recursos disponibles son limitados. Por ello, es aconsejable el empleo de técnicas computacionales para racionalizar y acotar el número de compuestos que se deben de preparar. La metodología seguida para este propósito ha consistido en un primer paso, en la creación de una *quimioteca virtual* de derivados de indazol de acuerdo a los siguientes criterios:

- *Accesibilidad sintética.* Todos los derivados calculados han de ser viables experimentalmente en todas sus etapas, bien a partir de derivados de indazol comerciales o accesibles sintéticamente a partir de precursores. Adicionalmente, se consideró que el resto de los reactivos utilizados en las distintas etapas fueran de origen comercial.

- Sustituyentes que confirieran al sistema variabilidad estructural desde un punto de vista químico.

- Sustituyentes en las posiciones N1 y en el oxígeno de la posición 3 que permitieran *a priori* las interacciones descritas con los aminoácidos del centro activo.

Con el objetivo de explorar la potencialidad de este sistema heterocíclico y utilizando estos criterios, se acotó el dominio experimental considerando tres posiciones de sustitución y diferentes sustituyentes en cada una de ellas (Fig. 27).

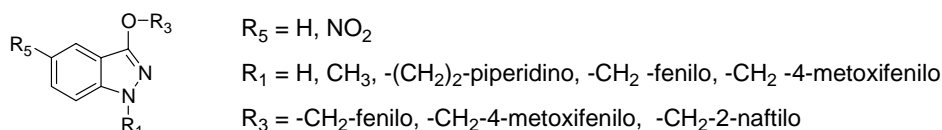


Figura 27. Derivados de indazol considerados para los estudios iniciales de *docking*.

Una vez construida la quimioteca virtual, el siguiente paso fue el estudio de las interacciones moleculares ligando–receptor de los derivados de indazol propuestos con el modelo teórico del receptor cannabinoide CB2, se realizó usando técnicas de *docking* (anclaje). Para ello, se utilizaron como modelos los complejos de los agonistas cannabinoides CB2R*-WIN55212-2 y CB2R*-JWH-015.

Posteriormente, se estudiaron los complejos de CB2R* con los 30 derivados de indazol resultantes de las combinaciones de los sustituyentes en las tres posiciones de sustitución consideradas del indazol (Fig. 27).

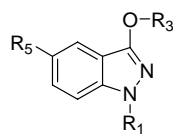
El estudio de la interacción del ligando con el receptor CB2 se llevo a cabo mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar se construyeron los complejos con cada uno de los ligandos y se minimizaron tanto las cadenas laterales del receptor CB2 como del derivado de indazol, empleando el campo de fuerzas MMFF94¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Estos complejos minimizados, sirvieron como entrada inicial para los estudios de *docking*, que fueron realizados con el programa FlexiDock^{130, 180} implementado en el

paquete de programas SYBYL 7.2.¹³⁰ FlexiDock es un programa de *docking* flexible, que realiza una búsqueda de las posibles orientaciones del ligando en el centro activo de la proteína, mediante el uso de algoritmos genéticos. Así, el programa analiza todas las posibles conformaciones del ligando en el interior del centro activo del receptor, modificando tanto las cadenas laterales del receptor como las conformaciones del ligando.

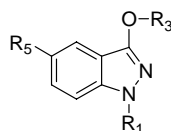
Una vez realizados los estudios con el programa FlexiDock, se analizó posteriormente, el cambio de la superficie accesible al disolvente (Δ ASA) de los aminoácidos del receptor CB2 en ausencia del ligando y en los complejos finales, empleando el programa STC.¹⁸¹ Este estudio permite identificar los residuos implicados en la interacción con el ligando cannabinoide ya que dichos mostrarán un mayor cambio en la superficie accesible al disolvente.

De los 30 derivados estudiados se sintetizaron 12 compuestos con una buena representación de la familia de éteres de indazol, tanto de la serie de los 5-nitroindazoles como de la serie 5-H y en función de la energía de interacción calculada, cuyos valores se encuentran recogidos en la tabla 8.

Tabla 8. Datos de afinidad (K_i) obtenidas para los éteres de indazol seleccionados.

	R_5	R_3	R_1	K_d hCB2 Teor. (μM)	K_i hCB2 Exp. (μM)
1	H	CH ₂ -(4-metoxifenilo)	H	$1,6 \times 10^{-4}$	$4,49 \pm 0,81$
2	H	CH ₂ -2-naftilo	H	$7,1 \times 10^{-5}$	$6,83 \pm 1,59$
3	H	CH ₂ -2-naftilo	Metilo	$3,0 \times 10^{-5}$	$10,1 \pm 2,4$
4	H	CH ₂ -2-naftilo	CH ₂ -CH ₂ -piperidino	$4,0 \times 10^{-6}$	$2,01 \pm 1,47$
5	H	CH ₂ -fenilo	CH ₂ -fenilo	$2,3 \times 10^{-6}$	$3,51 \pm 0,09$
6	H	CH ₂ -(4-metoxifenilo)	CH ₂ -(4-metoxifenilo)	$1,9 \times 10^{-6}$	$0,913 \pm 0,230$
7	NO ₂	CH ₂ -(4-metoxifenilo)	H	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,81 \pm 0,17$
8	NO ₂	CH ₂ -2-naftilo	H	$2,7 \times 10^{-5}$	$5,17 \pm 1,18$
9	NO ₂	CH ₂ -2-naftilo	Metilo	$1,5 \times 10^{-5}$	$3,50 \pm 2,57$
10	NO ₂	CH ₂ -2-naftilo	CH ₂ -CH ₂ -piperidino	$0,6 \times 10^{-6}$	$0,508 \pm 0,13$
11	NO ₂	CH ₂ -fenilo	CH ₂ -fenilo	$0,8 \times 10^{-6}$	$0,388 \pm 0,103$
12	NO ₂	CH ₂ -2-naftilo	CH ₂ -fenilo	$0,9 \times 10^{-6}$	$0,414 \pm 0,191$

Los resultados obtenidos, recogidos en la tabla 8, muestran que algunos compuestos exhiben una interesante afinidad por el receptor CB2. Con el fin de optimizar las propiedades cannabinoides de esta nueva familia de compuestos, se amplió el número de sustituyentes a considerar para cada una de las posiciones. Así, en la posición 5 del anillo, se incluyeron, además de los grupos H y nitro, grupos amino y bromo. Por su parte, en el oxígeno de la posición 3, se incluyó en el estudio un nuevo sustituyente aromático (1-naftilmetilo), ya que las interacciones aromáticas en esa posición parecían ser clave para la unión del ligando. Finalmente, en el nitrógeno de la posición 1 del esqueleto de indazol, se incluyeron tanto sustituyentes alquílicos de mayor longitud (propilo, pentilo), como nuevos aminoetilos sustituidos, similares al piperidinoetilo, como dimetilamino-, diisopropilamino-, pirrolidinil- y morfolinoetilo. (Fig. 28).



R ₅	R ₃	R ₁
H	CH ₂ -fenilo	H
NO ₂	CH ₂ -(4-metoxifenilo)	Metilo
NH ₂	CH ₂ -2-naftilo	Propilo
Br	CH ₂ -1-naftilo	Pentilo
	CH ₂ -fenilo	CH ₂ -fenilo
		CH ₂ -(4-metoxifenilo)
		CH ₂ -CH ₂ -piperidino
		CH ₂ -CH ₂ -N-pirrolidinilo
		CH ₂ -CH ₂ -morfolino
		CH ₂ -CH ₂ -N-diisopropilamino

Figura 28. Derivados de indazol considerados para la síntesis de nuevos derivados.

Teniendo en cuenta que los estudios de docking nos permiten la predicción de la actividad cannabinoide para los derivados de la familia de éteres de indazol propuesta, parece necesario introducir nuevos criterios para el diseño de cannabinoides multidiana con actividad en el sistema colinérgico. Con este propósito, se realizó un diseño (Fig. 24) combinando datos teóricos de modelización, junto con datos experimentales de acuerdo a los siguientes estudios:

- Estudios de *docking* en el receptor CB2.
- Estudios experimentales de actividad cannabinoide en tejido.
- Estudios experimentales de inhibición en AChE/BuChE.

5. QUÍMICA

5.1. ANTECEDENTES.

5.2. SÍNTESIS DE ÉTERES DE INDAZOLILO.

5.3. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Con el fin de realizar una exposición clara en cuanto al desarrollo sintético, la discusión de los resultados se ha realizado exclusivamente en base a criterios químicos, si bien, como ya se ha comentado en el capítulo 4, la preparación de los nuevos derivados de éteres de indazolilo ha seguido un proceso iterativo de diseño, síntesis y evaluación farmacológica en función de los criterios descritos en el capítulo anterior.

Desde un punto de vista químico se tuvieron en cuenta dos aspectos importantes:

1.- *Variabilidad estructural*. Creación de un conjunto representativo de moléculas con diversidad estructural introduciendo sustituyentes con distintas características y, por tanto, con diferentes propiedades físico-químicas.

2.- *Accesibilidad sintética*. Todos los derivados fueron preparados bien a partir de derivados de indazol comerciales o accesibles sintéticamente a partir de precursores de origen comercial.

5.1. ANTECEDENTES.

El sistema heterocíclico de 3-indazolol es conocido desde hace más de un siglo, siendo descrito por vez primera en un trabajo de Fischer en 1880¹⁸². Un aspecto relevante de las propiedades de los 3-indazolol, es el que se refiere a su tautomería. Este sistema heterocíclico presenta dos formas predominantes, tal como se representa en la figura 29.

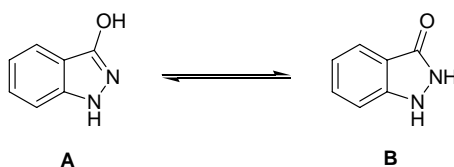


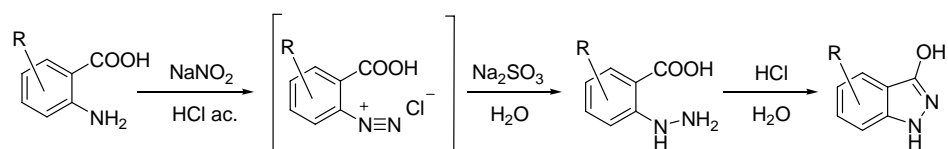
Figura 29. Formas tautoméricas del 3-indazolol.

Este equilibrio ha sido estudiado por diferentes autores mediante IR y UV con diferentes interpretaciones de los resultados, lo que hace que la estructura predominante de la molécula en distintas condiciones experimentales no esté todavía claramente definida. Así por ejemplo, Evans *et al.*¹⁸³ describen la existencia predominante de la forma

enólica (A) tanto en estado sólido (KBr) como en disolución de cloroformo. Sin embargo, en las conclusiones alcanzadas por Elguero *et al.*¹⁸⁴, si bien se describe igualmente la forma enólica (A) como la predominante en disolución etílica, se afirma que la forma tautomérica existente en estado sólido corresponde a la forma B, en discrepancia con Evans.

La preparación de 3-indazoles puede abordarse mediante diferentes procedimientos sintéticos. Así, se han descrito distintos métodos para la síntesis de 1-*H*-3-indazoles, así como para derivados del mismo sustituidos en el anillo bencénico^{182, 185-187}. Pese a la antigüedad de estos artículos, el procedimiento de síntesis planteado sigue plenamente vigente, como demuestra su utilización en artículos posteriores, donde se sintetizan nuevos derivados de 3-indazolol mediante las mismas rutas sintéticas con mínimas variaciones¹⁸⁸⁻¹⁹³. Dos son las rutas sintéticas más importantes desde el punto de vista del rendimiento obtenido, diferenciándose sobre todo en el compuesto de partida utilizado (Esquemas 1 y 2).

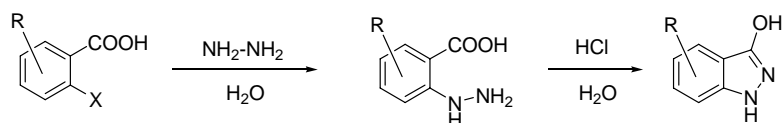
El primer procedimiento descrito¹⁸², parte de un ácido antranílico, con un primer paso de formación de la sal de diazonio, reducción de la misma con sulfito sódico para dar el correspondiente ácido α -hidrazinobenzoico y posterior ciclación en medio ácido, obteniéndose así el 3-indazolol (Esq. 1).



Esquema 1. Ruta sintética de los derivados de 3-indazolol a partir de ácidos antranílicos.

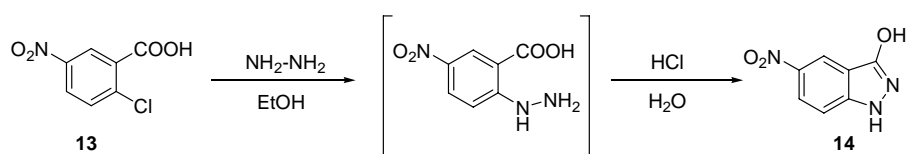
El segundo procedimiento más utilizado para la síntesis de 3-indazolol, que consta de dos etapas, tiene a los ácidos 2-halobenzóicos o sus correspondientes ésteres como compuesto de partida^{187, 190, 192, 193}. El primer paso es la sustitución nucleófila aromática del

halógeno por la hidracina en medio acuoso, cuya posterior ciclación en medio ácido da lugar al correspondiente 3-indazolol (Esq. 2).



Esquema 2. Ruta sintética de los derivados de 3-indazoles a partir de derivados de ácidos 2-halobenzóicos.

En el trabajo aquí presentado, se ha empleado ésta última ruta sintética como base para la síntesis del 5-nitro-1-*H*-3-indazolol, eligiéndola tanto por la simplicidad de la reacción como por su rendimiento. No obstante, se han introducido algunas modificaciones sintéticas para mejorar el proceso de la reacción, al realizar el primer paso de la ruta utilizando etanol como disolvente en vez de agua, facilitando así el aislamiento del producto mediante una simple filtración, una vez enfriado el medio de reacción (Esq.3). Así, partiendo del ácido 2-cloro-5-nitrobenzóico (**13**) obtenemos el 5-nitro-1-*H*-3-indazolol (**14**)¹⁸⁷, compuesto de partida utilizado para la obtención de una de nuestras series, mediante sucesivas modificaciones químicas.



Esquema 3. Síntesis del derivado 5-nitro-1-*H*-3-indazolol (**14**).

Tanto el primer como el segundo paso de reacción transcurren con buenos rendimientos, siendo el rendimiento global cercano al 80%.

Aunque hay descritos algunos derivados sustituidos en el oxígeno de la posición 3 del 3-indazolol¹⁹³⁻²⁰⁴, la mayoría de ellos corresponden a carboxilatos²⁰¹ o derivados de éstos^{198, 201}, alquilderivados^{193, 201, 204} o aminoalquilderivados¹⁹⁵. Adicionalmente, se han

descrito algunos derivados sustituidos con un bencilo o bencilos monosustituidos en el oxígeno de la posición 3^{193, 194, 196, 197, 199-203}.

En cuanto a las propiedades farmacológicas descritas para algunos derivados 1,3 disustituidos de 3-indazolol, se pueden citar: activación del receptor de óxido nítrico²⁰⁵, inhibición de la agregación plaquetaria²⁰⁵, actividad antihelmíntica²⁰⁶, antiulcerosa²⁰⁶, antibiótica²⁰⁷, antivirales²⁰⁸ y anti-*T. cruzi*^{197, 202}.

5.2. SÍNTESIS DE ÉTERES DE INDAZOLILO.

Como ya se comentó en el capítulo de diseño, para la obtención de un conjunto representativo de éteres de indazolilo se consideraron tres posiciones de sustitución con diferentes sustituyentes para cada una de ellas (Fig. 30).

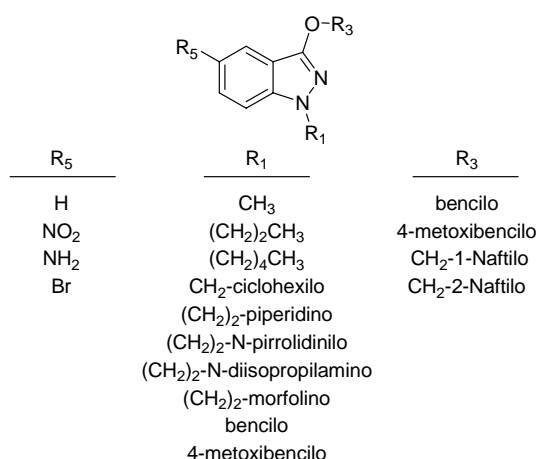
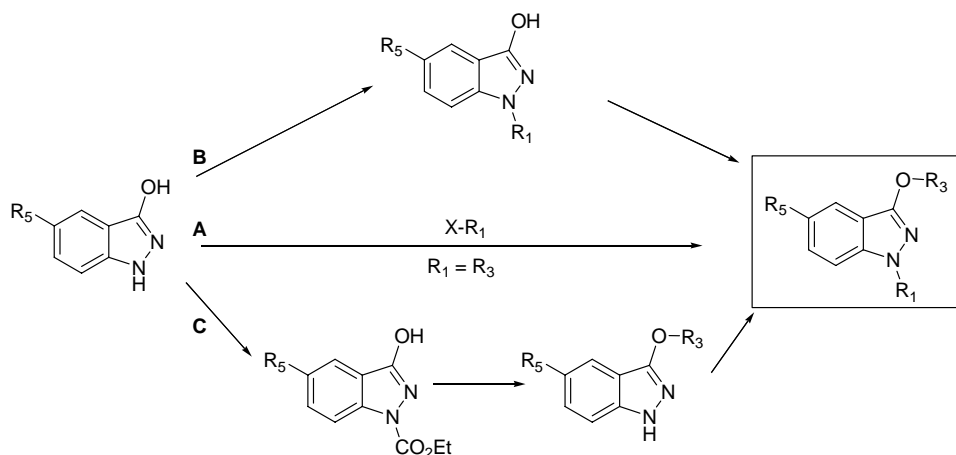


Figura 30. Sustituyentes elegidos para explorar la capacidad cannabinoide de los éteres de indazol.

La preparación de los éteres de 3-indazolilo, se planteó mediante tres rutas sintéticas alternativas (A, B, C) en función de los sustituyentes del sistema heterocíclico (Esq. 4).

La ruta sintética A es aplicable en el caso de que el derivado 1,3 disustituido de 3-indazolol tenga el mismo sustituyente tanto en la posición 1 como en el oxígeno de la

posición 3 ($R_1 = R_3$). Este procedimiento consiste en la reacción del derivado de 3-indazolol con el correspondiente haluro ($X-R_1$).



Esquema 4. Estrategias sintéticas utilizadas para la preparación de los éteres de indazol.

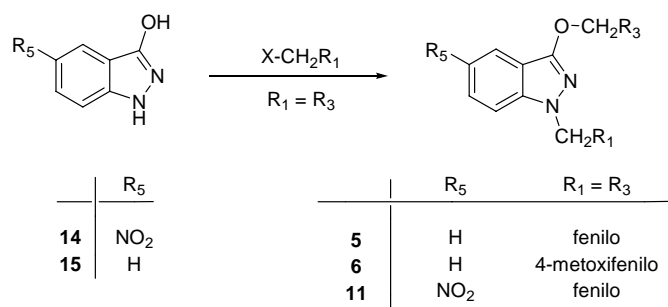
Por otra parte, para el caso de que los sustituyentes en las posiciones 1 y 3 sean distintos ($R_1 \neq R_3$), se plantearon dos posibles rutas sintéticas. Una primera vía corresponde a la ruta sintética B que consta de dos pasos. En el primer paso, se introduce el sustituyente en posición 1, mediante la reacción con el correspondiente haluro ($X-R_1$) y posteriormente en la posición 3, con un segundo haluro ($X-R_3$), obteniéndose así los correspondientes éteres de 3-indazolilo-1-sustituidos (Esq. 4).

La segunda estrategia posible para el caso en el que R_1 sea distinto de R_3 , consiste en la protección previa del nitrógeno de la posición 1, del derivado de 3-indazolol, mediante reacción con cloroformiato de etilo, para dar el correspondiente derivado de 1-etoxicarbonil-3-indazolol. Posteriormente, se introducen los sustituyentes deseados en el oxígeno de la posición 3, por reacción con los correspondientes haluros ($X-R_3$). Finalmente, la consiguiente desprotección, con hidróxido potásico en etanol, del grupo etoxicarbonilo del nitrógeno de la posición 1 y la reacción con los correspondientes haluros ($X-R_1$) conduce a los éteres de 3-indazolilo sustituidos en la posición 1.

Las dos primeras rutas sintéticas (A y B), con un menor número de pasos, podrían reducir *a priori* el tiempo y el coste necesario para la preparación de derivados con el mismo sustituyente, al ser en un solo paso (Ruta A, $R_1 = R_3$), o para derivados de 3-indazolol con diferentes sustituyentes en la posición 1 y en el oxígeno de la posición 3 (Ruta B, $R_1 \neq R_3$). Sin embargo, en la Ruta B, existen restricciones en cuanto a la naturaleza de los sustituyentes que se pueden introducir en la posición 1 (R_1), ya que éste no debe tener en su estructura grupos que puedan interferir en el siguiente paso. En las moléculas objetivo, ello se traduce en que no podemos utilizar esta ruta para los sustituyentes que contienen en su estructura un grupo amino como, por ejemplo, el grupo 2-morfolinoetilo o 2-piperidinoetilo, ya que podría dar lugar en el siguiente paso a la cuaternización de la amina. Además, en este caso, es necesario que el primer paso de la reacción con el haluro (R_1), sea selectivo, ya que en caso contrario se obtendría una mezcla de los productos monosustituídos en las posiciones 1, 2 y 3 o incluso de los productos disustituídos 1,2 y 1,3.

La ruta sintética C, pese al mayor número de pasos de reacción, no conlleva grandes pérdidas en el rendimiento global, ya que los pasos de protección y desprotección del nitrógeno de la posición 1 transcurren con buenos rendimientos. Además, tiene la ventaja de que esta vía conduce a una mayor diversidad estructural en las moléculas a sintetizar, lo que hace a esta ruta mucho más atractiva, puesto que sería de aplicación general para todos los derivados propuestos, independientemente del sustituyente en cada una de las posiciones consideradas. Es por todo ello, por lo que ha sido la ruta sintética utilizada para la obtención de un mayor número de derivados.

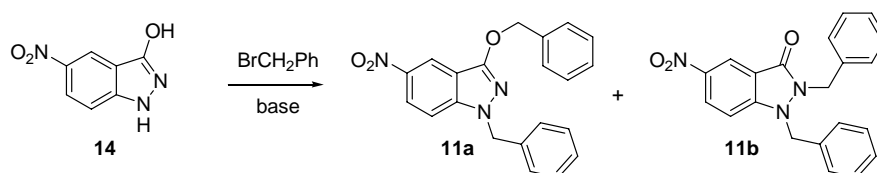
La ruta sintética **A** ha sido aplicada, tanto para la preparación de éteres de 5H- y de 5-nitroindazol, con el mismo sustituyente en las posiciones 1 y en el oxígeno de la posición 3, tal y como se recoge en el esquema 5. El procedimiento para la obtención de estos productos transcurre en un solo paso, mediante reacción de los 3-indazoles **1** y **2**, según el caso, con el haluro en exceso (Esq. 5). En el procedimiento experimental se ensayaron distintas condiciones de reacción, variando la base empleada, sin que se observara en general ningún cambio en cuanto a la selectividad de la reacción.



Esquema 5. Obtención de los derivados **5**, **6** y **11** mediante la ruta sintética A.

Siguiendo este esquema de reacción, los derivados dibencilados **5** y **11**¹⁹³ fueron sintetizados a partir de los correspondientes 3-indazoles **15** y **14** mediante reacción con bromuro de bencilo. De la misma forma, el derivado sustituido con 4-metoxibencilo en las posiciones 1 y en el oxígeno de la posición 3 del indazol **6**, se preparó mediante reacción con bromuro de 4-(metoxibencilo) del 1-*H*-3-indazolol (**15**).

En esta reacción, además de los éteres de indazol deseados, aparecían también los correspondientes isómeros disustituídos en las posiciones 1 y 2. Con la intención de obtener selectivamente o, al menos, en mayor proporción el éter de indazol deseado, se realizaron distintos ensayos, eligiendo para ello el compuesto **11**, haciendo variaciones sobre el disolvente, la base o las condiciones de preparación evaluando el efecto de la utilización del microondas (Esq. 6). La proporción de isómeros obtenida fue determinada mediante ensayos de ¹H-RMN, en función de la relación de integrales correspondientes a las señales del metileno del grupo bencilo.



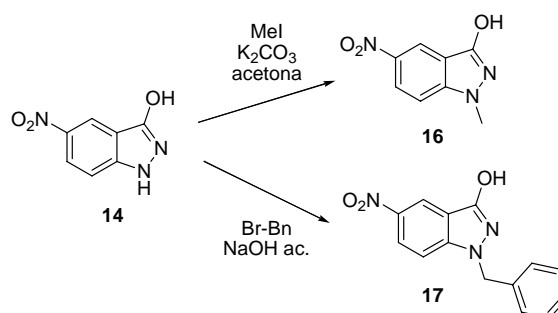
Esquema 6. Obtención de los isómeros **11a** y **11b** mediante la ruta sintética A.

En cuanto al disolvente, se realizó el ensayo a reflujo de varios disolventes (acetona, butanona, etanol, dicloroetano, agua, tolueno, 1,4-dioxano, acetonitrilo y THF) y, en casi todos los casos, se obtenía una proporción similar de isómeros, observándose en mayor proporción el éter de indazol deseado, salvo en la reacción llevada a cabo en los disolventes tolueno, THF y, especialmente, en 1,4-dioxano, donde esta tendencia se llegaba incluso a invertir.

En relación a la base empleada (K_2CO_3 , Cs_2CO_3) no se encontraron diferencias significativas en la proporción de isómeros obtenidos.

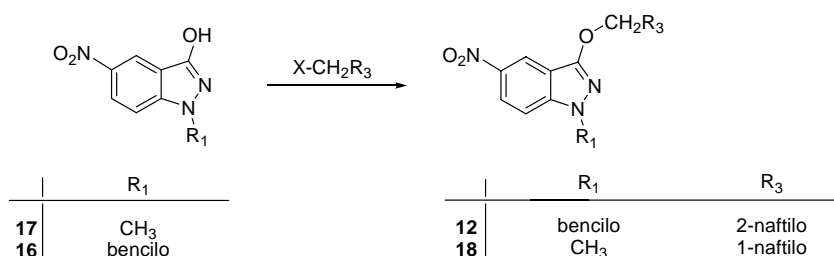
Finalmente, se llevó a cabo la reacción mediante un reactor microondas, utilizando los mismos disolventes, no observándose ningún cambio en cuanto a la proporción de isómeros obtenida, aunque sí en el tiempo de reacción necesario, ya que la reacción finalizaba, en algunos casos, en tan sólo 30 min.

La ruta sintética B se utilizó para la preparación de los derivados con diferentes sustituyentes en la posición 1 y en el oxígeno de la posición 3. En primer lugar, se prepararon los derivados monosustituídos en posición N-1. Así, la síntesis de los 5-nitroderivados de 1-metil-3-indazolol **16**²⁰⁹ y 1-benzil-3-indazolol **17**¹⁹³ se llevó a cabo a partir de **14** con yoduro de metilo o bromuro de bencilo, respectivamente (Esq. 7). En el primer caso, la reacción se realizó en acetona con carbonato potásico, mientras que el derivado bencilado se obtuvo en una disolución acuosa de hidróxido sódico¹⁸⁵.



Esquema 7. Síntesis de los 5-nitroderivados de 3-indazolol sustituidos en la posición 1.

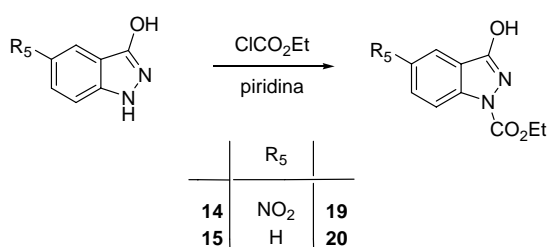
Una vez obtenidos los derivados sustituidos en la posición 1, se procedió a la introducción del segundo sustituyente en el oxígeno de la posición 3 (Esq. 8). Así, la síntesis de los 3-naftilmetoxiderivados **12** y **18** se realizó mediante la reacción de **17** y **16** con cloruro de 1-naftilmetilo o bromuro de 2-naftilmetilo en acetona a reflujo, utilizando como base carbonato de cesio y de potasio, respectivamente.



Esquema 8. Síntesis de los derivados de 3-indazolol 1,3 disustituídos a partir de derivados monosustituídos en posición 1.

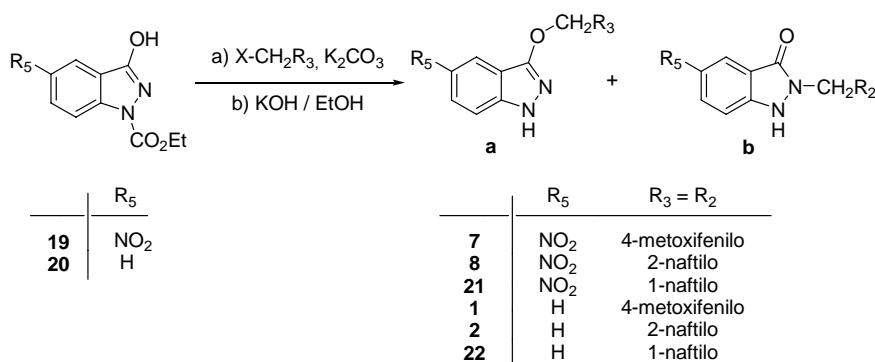
Como ya se indicó en la introducción, estas dos rutas sintéticas tienen muchas limitaciones, por lo que la vía sintética alternativa C, mucho más versátil, ha sido la utilizada para la obtención de la mayor parte de los derivados de indazol (Esq. 1).

El primer paso de reacción, común para todos los compuestos, consiste en la protección de la posición 1 del sistema heterocíclico. Así, los 1-etoxycarbonilderivados **19** y **20**, se sintetizaron mediante la reacción de los 3-indazoles **14** y **15** con cloroformiato de etilo en piridina, respectivamente (Esq. 9).



Esquema 9. Protección de la posición 1 mediante la formación de los etoxycarbonil-derivados **19** y **20**.

El segundo paso de reacción consiste en la introducción de un primer sustituyente en la posición 3 del anillo de indazol (Esq. 10). Sin embargo, cuando se llevó a cabo la reacción de 5-nitroindazol protegido **19** con los bromuros de 4-metoxibencilo y de 2-naftilmetilo y con el cloruro de 1-naftilmetilo, se obtuvieron una mezcla de los correspondientes éteres de indazol **7a**, **8a** y **21a** respectivamente, junto con las indazolonas resultantes de la sustitución en la posición N-2 **7b**, **8b** y **21b**. Las reacciones se llevaron a cabo en butanona y carbonato potásico, excepto para la preparación del compuesto **21**, en las que fue necesaria la utilización de condiciones más enérgicas, utilizando como disolvente N,N-dimetilformamida y llevando a cabo la reacción a una temperatura de 100 °C.

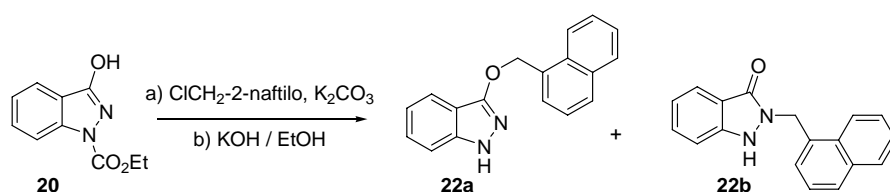


Esquema 10. Productos obtenidos tras las reacciones de alquilación y desprotección de los derivados **19** y **20**.

Análogamente, la reacción de **20** con los haluros de 4-metoxibencilo, 2-naftilmetilo y 1-naftilmetilo, conduce a una mezcla de los correspondientes éteres de 1-etoxycarbonilindazol **1a**, **2a** y **22a** junto con 3-indazolonas sustituidas en la posición 2 (**1b**, **2b** y **22b**) cuando se lleva a cabo la reacción en butanona o 1,4-dioxano y carbonato potásico.

La reacción de desprotección de los correspondientes 1-etoxycarbonilindazoles **a** y **b** de **1**, **2**, **7**, **8**, **21** y **22**, se llevó a cabo a temperatura ambiente en una disolución de hidróxido potásico en etanol (Esq. 10), procediéndose después a la separación de la mezcla de isómeros **a** y **b** mediante columna cromatográfica (ver parte experimental, sección 10.1).

En esta reacción, del mismo modo que en la ruta sintética A, se han realizado numerosos estudios experimentales con el fin de aumentar el porcentaje del derivado O-sustituido en relación al N-sustituido, ya que no ha sido posible la obtención selectiva de una u otra forma. En esta ocasión, el estudio se hizo con la reacción de síntesis del derivado **22** (Esq. 11), realizando los mismos ensayos que en el estudio comentado anteriormente para la obtención del derivado **11**. La proporción de isómeros obtenida fue determinada mediante ensayos de ^1H -RMN, en función de la relación de integrales correspondientes a las señales del metileno del grupo benzilo.



Esquema 11. Obtención de los isómeros **22a** y **22b** mediante la ruta sintética C.

En este caso, la elección de la base sí que fue importante, ya que el uso de Cs_2CO_3 , provocaba la desprotección parcial del producto de partida, por lo que todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando K_2CO_3 como base.

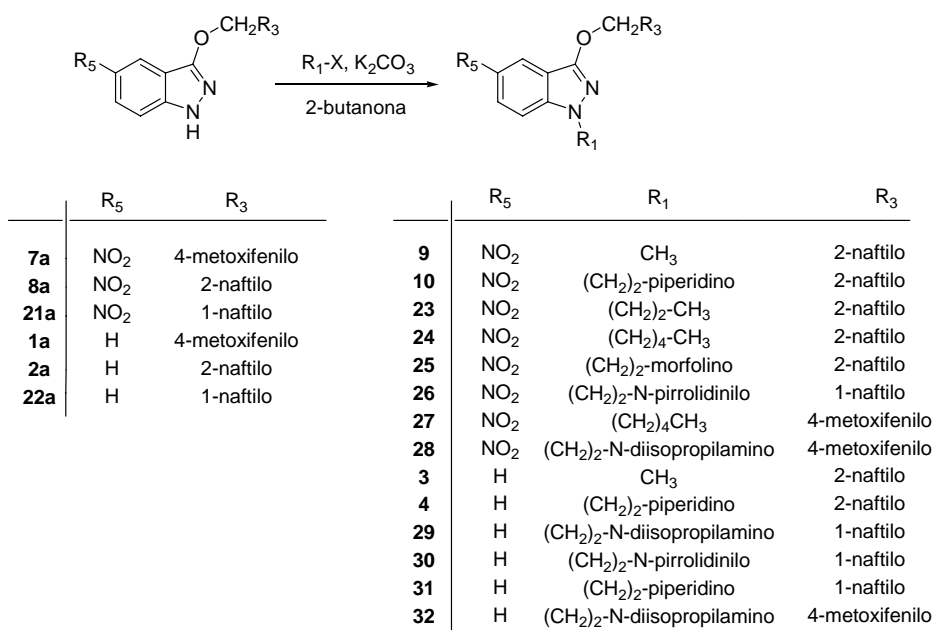
El uso de microondas tampoco ofreció mejores resultados en cuanto a un aumento en la proporción del isómero empleado, aunque sí respecto al tiempo de reacción, donde nuevamente se reducía considerablemente, llegando a término la reacción en aproximadamente 1 hora.

Respecto a la elección del disolvente, se observó que, en este caso, el disolvente que conducía a la obtención de una mayor proporción del éter de indazol deseado fue, contrariamente a lo ocurrido en el estudio anterior (Esq. 6), el 1,4-dioxano, pero cuando se intentó escalar la reacción a cantidades no meramente analíticas, existían problemas de solubilidad que ocasionaban finalmente la desprotección del producto de partida, por lo que, finalmente, se eligió la butanona como disolvente general.

Estos resultados, junto con los obtenidos en el estudio de la reacción de síntesis del derivado **11** (Esq. 6), conducen a la conclusión de que en este tipo de reacciones, el factor más determinante en cuanto a la proporción entre los dos isómeros, es tanto el indazol de partida, como la naturaleza del sustituyente que se quiera introducir en el oxígeno de la posición 3 del indazol, obligando a que para intentar obtener la proporción de isómeros deseada en cada caso, haya que estudiar cada reacción en particular.

Una vez introducido el sustituyente en el oxígeno de la posición 3, se procedió a la introducción del segundo sustituyente en el nitrógeno de la posición 1 del sistema de indazol (ruta sintética C, Esq. 12). Para ello se hicieron reaccionar los correspondientes éteres de indazol con los haluros adecuados en butanona y carbonato potásico. La utilización de la butanona permite llevar a cabo la reacción a mayor temperatura con lo que se disminuye de manera considerable el tiempo de reacción respecto a las reacciones llevadas a cabo en acetona.

Los 1-alquilderivados del 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**8a**), **9**, **23** y **24**, se obtuvieron mediante reacción con los yoduros de metilo, propilo y pentilo, respectivamente. Del mismo modo, los dialquilaminoetilderivados **10** y **25**, se sintetizaron, utilizando también el compuesto **8a** como producto de partida, mediante reacción con los cloruros de 2-piperidinoetilo y de 2-morfolinoetilo, respectivamente. Por su parte, el derivado 3-(1-naftilmetoxi)-5-nitro-1-(2-(N-pirrolidinil)etil)indazol (**26**) se preparó haciendo reaccionar el 1-naftilmetoxiderivado **22a** con cloruro de 2-(N-pirrolidinil)etilo. Análogamente, la reacción de 3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitroindazol (**7a**) con yoduro de pentilo y con cloruro de 2-(N-diisopropilaminoetilo) dio lugar a los compuestos **27** y **28**.



Esquema 12. Obtención de los derivados de indazol 1,3 disustituidos a partir de los indazoles sustituidos en la posición 3.

Siguiendo la misma ruta sintética general C, se prepararon una serie de éteres de indazol sin sustitución en el anillo aromático del indazol mediante la introducción del segundo sustituyente en N-1, a partir de los correspondientes derivados sustituidos en el oxígeno de la posición 3 **1a**, **2a** y **22a**, tal y como se indica en el esquema 11. Así, a partir del compuesto 3-(2-naftilmetoxi)indazol (**2a**) se prepararon tanto el 1-metilderivado **3** como el 1-piperidinoetilderivado **4**, mediante reacción con yoduro de metilo y cloruro de 2-piperidinoetilo, respectivamente. Por otra parte, los 1-dialquilaminoetilderivados de 3-(1-naftilmetoxi)indazol **29** - **31** fueron sintetizados mediante reacción del derivado **22a** con los cloruros de 2-(N-diisopropilamino)etilo, 2-(N-pirrolidinil)etilo y 2-piperidinoetilo respectivamente. Finalmente, el 1-(2-(N-diisopropilamino)etil)derivado **32** se sintetizó a partir del compuesto 3-(4-metoxibencil)indazol (**1a**).

Introducción de nuevos grupos funcionales en el anillo aromático del indazol.

Para la modificación de los sustituyentes en la posición 5 del sistema de indazol, de entre los diferentes grupos posibles se consideraron dos con diferentes propiedades electrónicas. Por una parte el grupo amino, capaz de formar enlaces de hidrógeno y, por otra, un halógeno con débil efecto +K y -I.

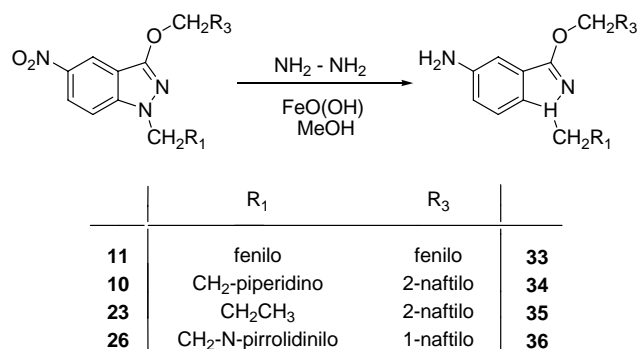
Tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica enfocada a la obtención de 5-aminoindazoles, no se encontraron condiciones de reacción aplicables a la reducción de éteres de nitroindazolilo, ya que aunque hay publicados métodos de reducción del grupo nitro en indazoles¹⁹⁰, la utilización de las condiciones descritas implican la destrucción de la función éter.

La obtención de derivados de 3-indazolol sustituidos en la posición 5 con un grupo amino, se abordó en primer lugar mediante la reducción del grupo nitro con hidracina, catalizada por una base de Lewis como el tricloruro de hierro FeCl_3 , utilizando un procedimiento descrito para nitrobenenos²¹⁰. Mediante este procedimiento fue posible la preparación de 5-amino-3-benciloxi-1-bencilindazol (**33**), a partir del 5-nitroderivado **11**, pero con muy bajo rendimiento, junto con numerosos productos secundarios que dificultaban su aislamiento y purificación.

Por tanto, manteniendo la estrategia propuesta, fue necesario estudiar otras condiciones de reacción. Los mejores resultados se obtuvieron modificando el catalizador utilizado, llevando a cabo la reacción con oxihidróxido de hierro III $\text{FeO}(\text{OH})$ mediante el tratamiento de tricloruro de hierro (FeCl_3) con hidróxido sódico (NaOH), mediante un método descrito por Lauwiner²¹¹, aunque aplicado hasta ahora solamente a derivados bencénicos.

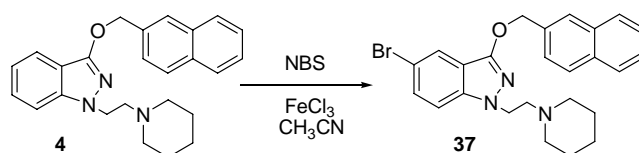
Así, la reducción de los 5-nitroindazoles **10**, **11**, **23**, **26** con hidracina en metanol, con $\text{FeO}(\text{OH})$ como catalizador, condujo a los correspondientes 5-aminoderivados **33** - **36**, (Esq. 13). Hay que resaltar que este procedimiento es aplicable para éteres arílicos de

indazol con sustituyentes en N-1 de tipo alquilo, bencilo y cicloalquilaminoetilo con unos altos rendimientos, en ocasiones casi cuantitativos.



Esquema 13. Ruta sintética para la obtención de los derivados de 5-aminoindazol **33** - **36**.

Finalmente, la obtención de 5-bromoindazoles se abordó mediante la introducción de un átomo de bromo en la posición 5 del sistema de indazol, con los sustituyentes deseados ya unidos a la posición 1 y al oxígeno de la posición 3. Para ello, se siguió el método descrito por Tanemura²¹², que consiste en una sustitución electrófila aromática utilizando como agente halogenante N-bromosuccinimida (NBS) y tricloruro de hierro (FeCl₃) como catalizador en acetonitrilo (Esq. 14). De esta forma, se obtuvo el 5-bromo-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**37**) a partir del derivado **4**.



Esquema 14. Ruta sintética para la obtención del 5-bromoderivado **37**.

5.3. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Las estructuras de todos los compuestos sintetizados han sido establecidas de acuerdo con los datos analíticos y espectroscópicos de ^1H -RMN, de ^{13}C -RMN y mediante análisis de HPLC-MS.

La asignación de las señales correspondientes a los carbonos y protones del anillo de indazol ha sido establecida en base a los desplazamientos químicos, la correlación de las señales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en los espectros bidimensionales HSQC y a la influencia de los sustituyentes existentes en la posición 5 del anillo aromático del indazol (Tabla 9).

En general, de los siete carbonos del sistema heterocíclico de indazol, la señal más desapantallada corresponde al carbono unido al átomo de oxígeno (C-3), apareciendo entre 158,9 - 153,5 ppm. Posteriormente aparece la señal del C-7a, de menor intensidad debido al carácter cuaternario del carbono, que aparece entre 140,3 y 143,5, salvo en el caso de los 5-aminoderivados, donde, por efecto del sustituyente, la señal se ve desplazada hasta alrededor de 136 ppm.

Por otra parte, los carbonos del sistema heterocíclico que aparecen a campo más alto son C-7 y C-3a, que apenas sufren modificación en su desplazamiento por el efecto de los sustituyentes del heterociclo, apareciendo siempre en torno a los 109 y 113 ppm, respectivamente. Hay que destacar que la señal del carbono C-3a, es de menor intensidad, debido al carácter cuaternario del mismo.

El C-5 es el carbono que más se ve afectado por la naturaleza del sustituyente en esa posición. Así, mientras que en los indazoles sin sustitución en el anillo esta señal aparece alrededor de los 120 ppm, cuando éste se encuentra sustituido tanto por un grupo nitro como amino, la señal se desplaza alrededor de los 140 ppm. En cambio, el efecto del grupo bromo en esa posición (compuesto **37**), desplaza la señal a una zona más apantallada (114 ppm).

Otros carbonos cuyas señales se ven bastante afectadas por la naturaleza del sustituyente de la posición 5 del heterociclo son el C-4 y el C-6. En el caso del primero, la señal aparece entre 118 y 120 ppm para el caso de los 5-H y 5-nitroindazoles, algo más desapantallada para el 5-bromoderivado **37** (122,6 ppm), y alrededor de los 100 ppm para el caso de los 5-aminoderivados. En el caso del C-6, el efecto del sustituyente es menor, apareciendo la señal en torno a los 119 ppm para el caso de los 5-aminoderivados, algo más apantallado para el caso de los 5-nitroindazoles (122 ppm) y a un campo más bajo para el caso de los indazoles sin sustitución en anillo (127 ppm). Finalmente, en el caso del 5-bromoderivado **37**, la señal se observa aún más desapantallada, a 130,3 ppm.

Por otra parte, la caracterización de los isómeros tipo indazolol (**a**) y tipo indazolona (**b**) de los compuestos **1**, **2**, **7**, **8**, **21** y **22**, fue realizada a partir de las señales de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN (los datos espectroscópicos de cada compuesto se encuentran en la parte experimental, sección 10.1).

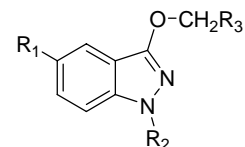
Respecto al espectro de ^1H -RMN, en los éteres de indazolilo (isómeros **a**), donde el sustituyente R_3 está unido al oxígeno en la posición 3, la señal correspondiente al grupo CH_2 de dicho sustituyente aparece entre 5,38 y 5,85 ppm, mientras que en las 3-indazolonas sustituidas en la posición 2 (isómeros **b**), donde el sustituyente R_3 está unido al átomo N-2, esta señal aparece siempre alrededor de 0,4 ppm más apantallada que su correspondiente isómero. Por otro lado, cuando los experimentos de RMN se realizan utilizando como disolvente DMSO-d_6 , la señal del H-N1, aparece en los 5H-derivados alrededor de 12,04 ppm, y para el caso de los 5-nitroderivados cercano a 12,70 ppm, mientras que la señal de sus respectivos isómeros **b** aparece alrededor de 10,26 y 12,00 ppm respectivamente, según sean 5-H o 5-nitroderivados.

Acerca de los experimentos de ^{13}C -RMN, la diferencia en el desplazamiento de la señal del carbono del grupo CH_2 del sustituyente R_3 entre ambas estructuras, es mucho más significativa que en los espectros de ^1H -RMN, ya que las señales en los éteres de indazolilo (isómeros **a**) aparecen alrededor de 70 ppm, mientras que en los isómeros **b**, esta señal aparece entre 50 y 55 ppm. Otra señal que se ve afectada es la que

corresponde al C-3, ya que según su señal se ve desplazada de alrededor 157 ppm a 161 ppm, según se trate del isómero éter (**a**) o la indazolona (**b**).

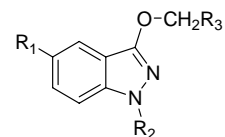
Por otra parte, los datos obtenidos de HPLC-MS indican una clara diferencia entre los éteres de indazolilo (isómeros tipo **a**) y las 3-indazolonas (isómeros tipo **b**) en cuanto a sus tiempos de retención (tr). Utilizando un gradiente en 6 minutos de CH₃CN / H₂O de 10:90 a 100:0 se obtienen para los éteres de indazolilo unos tiempos de retención próximos a 5,5 min, mientras que las 3-indazolonas sustituidas en la posición 2 se encuentran en un tiempo de retención de alrededor de 4 min (ver parte experimental, sección 10.1).

Tabla 9. Desplazamientos químicos (ppm) de ¹³C-RMN de los éteres de indazol sintetizados



Compuesto	Disolvente	R ₅	R ₁	R ₃	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a
1	CDCl ₃	H	H	4-metoxifenilo	157,6	112,9	119,8	120,0	127,8	109,6	142,6
2	DMSO	H	H	2-naftilo	155,6	111,2	119,0	119,1	127,1	110,1	141,8
3	CDCl ₃	H	metilo	2-naftilo	155,6	112,5	118,9	120,1	125,8	108,5	142,0
4	CDCl ₃	H	piperidinoetilo	2-naftilo	155,6	112,6	118,9	120,1	127,0	108,7	141,6
5	CDCl ₃	H	bencilo	fenilo	155,8	113,1	119,2	120,2	127,0	108,8	141,7
6	CDCl ₃	H	4-metoxibencilo	4-metoxifenilo	156,2	113,6	119,5	120,6	127,7	109,3	141,9
7	DMSO	NO ₂	H	4-metoxifenilo	159,6	110,9	117,8	140,7	122,4	111,3	143,5
8	CDCl ₃	NO ₂	H	2-naftilo	158,8	112,3	118,4	141,7	123,1	109,8	143,7
9	CDCl ₃	NO ₂	metilo	2-naftilo	157,5	112,0	118,7	140,9	122,6	108,5	143,0
10	CDCl ₃	NO ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	157,5	112,0	118,6	140,8	122,3	109,0	143,1
11	DMSO	NO ₂	bencilo	fenilo	157,2	111,6	118,0	141,0	122,8	110,8	143,0
12	DMSO	NO ₂	bencilo	2-naftilo	156,8	111,3	117,7	140,6	122,4	110,4	142,6
18	CDCl ₃	NO ₂	metilo	1-naftilo	157,5	112,0	118,7	140,8	122,6	108,5	143,0
21	DMSO	NO ₂	H	1-naftilo	157,5	110,4	117,3	140,2	123,6	111,1	143,4
22	CDCl ₃	H	H	1-naftilo	155,6	111,1	119,0	119,0	127,1	110,1	141,8

Continuación Tabla 9. Desplazamientos químicos (ppm) de ^{13}C -RMN de los éteres de indazol sintetizados



Compuesto	Disolvente	R ₅	R ₁	R ₃	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a
23	CDCl ₃	NO ₂	propilo	4-metoxifenilo	157,8	112,3	119,2	141,1	122,8	108,9	143,0
24	CDCl ₃	NO ₂	pentilo	2-naftilo	157,4	111,9	118,8	140,8	122,4	108,5	142,5
25	CDCl ₃	NO ₂	morfolinoetilo	2-naftilo	157,5	112,1	118,7	140,9	122,3	108,8	143,1
26	CDCl ₃	NO ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	158,0	112,3	118,3	141,6	123,5	109,8	143,4
27	CDCl ₃	NO ₂	pentilo	4-metoxifenilo	157,5	112,0	118,8	140,7	122,4	108,4	142,5
28	CDCl ₃	NO ₂	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	158,0	112,2	119,1	141,0	122,6	109,5	143,6
29	CDCl ₃	H	N-diisopropilaminoetilo	1-naftilo	156,0	112,8	118,7	120,1	127,0	109,3	142,2
30	CDCl ₃	H	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	155,8	112,8	119,1	120,2	127,4	108,7	141,6
31	DMSO	H	piperidinoetilo	1-naftilo	155,8	112,7	119,1	120,1	127,1	108,8	141,6
32	CDCl ₃	H	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	156,0	111,8	119,0	120,4	127,4	109,2	142,1
33	DMSO	NH ₂	bencilo	fenilo	153,7	112,9	99,6	141,9	119,0	110,4	136,3
34	CDCl ₃	NH ₂	propilo	2-naftilo	154,9	113,3	103,2	139,2	119,5	109,9	137,7
35	CDCl ₃	NH ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	153,5	111,9	102,0	137,8	118,2	108,5	136,4
36	CDCl ₃	NH ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	154,8	113,2	102,9	139,1	119,4	109,6	137,5
37	CDCl ₃	Br	piperidinoetilo	2-naftilo	154,8	111,8	122,6	114,1	130,3	110,4	140,3

6. FARMACOLOGÍA

6.1. EFECTO CANNABINOIDE.

Estudios de desplazamiento de radioligando (binding).

Estudios in vitro en tejido deferente de ratón.

6.2. EFECTO COLINÉRGICO.

Ensayos de Inhibición Enzimática.

Estudios de competición.

6.3. EFECTO NEUROPROTECTOR ANTIOXIDANTE.

Ensayos ORAC.

6.4. TOXICIDAD.

Test de Ames.

Los nuevos compuestos sintetizados fueron evaluados farmacológicamente para determinar su posible actividad farmacológica de acuerdo a una serie de criterios enfocados al descubrimiento de cannabinoides con actividad agonista CB2 e inhibidora de las enzimas colinesterasas AChE/BuChE.

Los criterios utilizados, que se encuentran esquematizados en la figura 31, recogen los diferentes estudios realizados para determinar la actividad cannabinoide y colinérgica de los derivados de éter de indazolilo sintetizados.

En primer lugar se realizaron estudios de unión sobre los receptores cannabinoides CB1 y CB2, realizados por la Dra. Concepción Pérez en el grupo del profesor Javier Fernández Ruiz de la Universidad Complutense de Madrid y estudios en tejido para determinar el efecto cannabinoide como agonistas, llevados a a cabo por el grupo de la profesora M^a Isabel Martin-Fontelles en la Universidad Rey Juan Carlos I.

Por otra parte, se realizaron ensayos para determinar la capacidad de inhibir a las enzimas acetil- (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), estudiándose asimismo, su mecanismo de inhibición mediante ensayos de competición.

Además, se realizaron estudios para determinar la capacidad antioxidante de aquellos compuestos que presentaban propiedades farmacológicas más interesantes. Los ensayos tanto de actividad colinérgica como del efecto antioxidante, fueron realizados por la Dra. Concepción Pérez en el Instituto de Química Médica del CSIC.

Por último, se realizaron ensayos de toxicidad para evaluar el potencial mutagénico de algunos derivados, seleccionados en función de su estructura, mediante el Test de Ames. Estos ensayos fueron hechos en los laboratorios de la Dra. Mercedes González y Hugo Cerecetto de la Universidad de la República de Uruguay

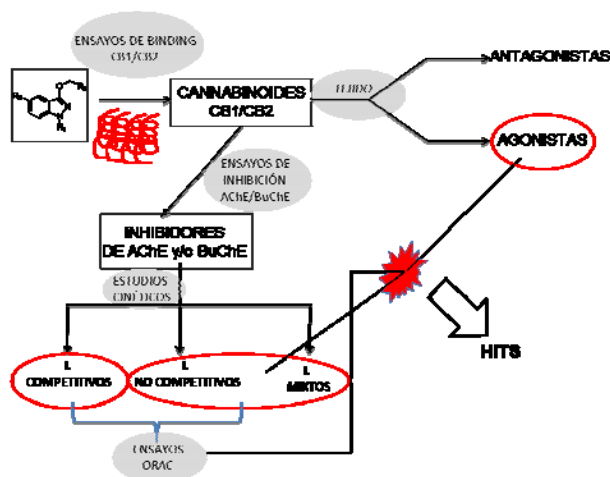


Figura 31. Esquema representativo para el descubrimiento de nuevos “hits”.

6.1. EFECTO CANNABINOIDE.

Estudios de desplazamiento de radioligando (*binding*).

Para evaluar la actividad cannabinoide de los nuevos éteres de indazol sintetizados, se ha determinado la afinidad *in vitro* en células (HEK293EBNA) por los receptores cannabinoides de los compuestos **9**, **11**, **12**, **18**, **19**, **22-46**, cuyas estructuras se recogen en la tabla 9, determinando la capacidad que tienen para desplazar al radioligando [³H]-CP55940 del sitio de unión (ver parte experimental, sección 10.2).

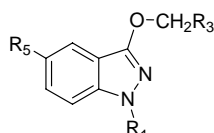
Los resultados obtenidos, recogidos en la tabla 10, indican que todos los derivados evaluados muestran afinidad significativa por los receptores cannabinoides CB1 y/o CB2. En relación al receptor CB1, algunos de los derivados ensayados no muestran afinidad y corresponden en general a 5-nitro-1-metilindazoles y a derivados con el sustituyente diisopropilaminoetilo en posición 1. Los compuestos con mayor actividad cannabinoide CB1 corresponden a los 1-pirrolidiniletindazoles **26** y **30** y al 1-propilderivado **23**.

En general, la afinidad por el receptor CB2 es mayor en los derivado de 5-nitroindazol en relación a los indazoles sin sustituir en posición 5, excepto en la pareja **21-22**. Una

tendencia similar se observa en los derivados de 5-nitroindazol cuando los derivados de indazol están sustituidos en la posición 1.

En relación a la selectividad CB2, se puede observar que es mayor en los 5-nitroderivados respecto de los derivados sin sustitución, excepto en el caso de los compuestos **2** y **32**, que muestran una ligera selectividad CB1.

Tabla 10. Resultados obtenidos en los ensayos de desplazamiento de radioligando.



Nº	R ₅	R ₁	R ₃	K _i CB2 (µM)	K _i CB1 (µM)	selectividad CB2
1	H	H	4-metoxifenilo	4,49 ± 0,81	21,0 ± 6,1	4,68
2	H	H	2-naftilo	6,83 ± 1,59	21,7 ± 20,8	3,18
3	H	metilo	2-naftilo	10,1 ± 2,4	4,00 ± 1,98	0,40
4	H	piperidinoetilo	2-naftilo	2,01 ± 1,47	1,42 ± 0,54	0,71
5	H	bencilo	fenilo	3,51 ± 0,09	2,59 ± 0,9	0,74
6	H	4-metoxibencilo	4-metoxifenilo	0,913 ± 0,230	2,36 ± 0,67	2,58
7	NO ₂	H	4-metoxifenilo	1,81 ± 0,17	>40	>22
8	NO ₂	H	2-naftilo	5,17 ± 1,18	13,6 ± 5,4	2,63
9	NO ₂	metilo	2-naftilo	3,50 ± 2,57	> 40	>11
10	NO ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	0,508 ± 0,13	1,26 ± 0,43	2,48
11	NO ₂	bencilo	fenilo	0,388 ± 0,103	1,20 ± 0,35	3,13
12	NO ₂	bencilo	2-naftilo	0,414 ± 0,191	>10	>24
18	NO ₂	metilo	1-naftilo	0,254 ± 0,063	> 40	>157
21	NO ₂	H	1-naftilo	0,919 ± 0,245	>40	>43
22	H	H	1-naftilo	0,439 ± 0,084	1,64 ± 0,13	3,74
23	NO ₂	propilo	2-naftilo	0,470 ± 0,04	0,356 ± 0,006	0,76
24	NO ₂	pentilo	2-naftilo	1,37 ± 0,06	1,60 ± 0,13	1,16
25	NO ₂	morfolinoetilo	2-naftilo	0,544 ± 0,217	1,38 ± 0,08	2,54
26	NO ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	0,132 ± 0,019	0,618 ± 0,148	4,68
27	NO ₂	pentilo	4-metoxifenilo	0,487 ± 0,056	7,51 ± 1,58	14,29
28	NO ₂	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	8,87 ± 2,16	>40	>4,5
29	H	N-diisopropilaminoetilo	1-naftilo	5,40 ± 0,90	> 40	>7,4
30	H	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	0,370 ± 0,190	0,564 ± 0,086	1,52
31	H	piperidinoetilo	1-naftilo	0,238 ± 0,050	3,19 ± 1,6	13,4
32	H	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	7,68 ± 2,00	> 40	>5,2
33	NH ₂	bencilo	fenilo	1,65 ± 0,29	3,87 ± 1,41	2,34
34	NH ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	2,35 ± 1,36	> 40	>17
35	NH ₂	propilo	2-naftilo	2,90 ± 0,70	1,64 ± 0,23	0,57
36	NH ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	4,64 ± 1,5	1,13 ± 0,29	0,24
37	Br	piperidinoetilo	2-naftilo	1,81 ± 0,73	1,67 ± 0,22	0,92
WIN				0,009± 0,003	0,002± 0,001	0,22

Estudios *in vitro* en tejido deferente de ratón.

El estudio de un compuesto en tejido aislado permite simplificar los estudios *in vivo* al eliminarse los factores de distribución, metabolismo y excreción. Estos ensayos contribuyen a la valoración de la funcionalidad del compuesto probado, y, en particular, al establecimiento de sus propiedades agonistas o antagonistas. La caracterización *in vitro* de la actividad cannabinoide de los nuevos compuestos sintetizados se llevó a cabo mediante el ensayo típico para el estudio y la determinación del tipo de efecto cannabinoide²¹³, que consiste en la realización de ensayos de inhibición dosis-dependiente del efecto contráctil producido por estimulación eléctrica en conducto deferente de ratón. Diferentes receptores median la inhibición de esta respuesta, como los receptores adrenérgicos, purinérgicos y cannabinoides. Las sustancias de naturaleza agonista cannabinoide presentan la capacidad de inhibir las contracciones inducidas eléctricamente, probablemente producida por un efecto a nivel presináptico, reduciendo los niveles de ATP y disminuyendo la liberación de neurotransmisores que producen contracción de la musculatura lisa, mediante un mecanismo de bloqueo de la liberación de acetilcolina. Este efecto podría ser el resultado, a su vez, de la inhibición de flujos de Ca^{2+} producida por los cannabinoides. En cambio, los antagonistas son capaces de bloquear este efecto inhibitorio y los agonistas inversos producen el efecto contrario de aumento de la contracción.

El estudio de todos los compuestos se ha realizado utilizando como referencia el efecto de cannabinoides bien caracterizados, como son el agonista WIN55212-2 y los antagonistas AM251 (selectividad CB1) y AM630 (selectividad CB2). Los valores de inhibición contráctil alcanzados por cada compuesto a las 5 concentraciones ensayadas, se recogen en la parte experimental (sección 10.2).

En las figuras 32, 33 y 34 se muestran los perfiles farmacológicos mostrados en este ensayo de todos los derivados evaluados junto con el del compuesto de referencia WIN55212-2. En relación a los 5-nitroindazoles, los resultados obtenidos indican que algunos compuestos (**10**, **11**, **12**, **25** y **26**) producen una inhibición de la contracción de

entre el 30 y el 50%, y por tanto se comportan como agonistas parciales (Fig. 33). El resto de los 5-nitroderivados evaluados **9**, **18**, **23**, **24**, **27** y **28** no mostraron efecto significativo como agonistas en tejido (< 27%) (Fig. 34).

En relación a los indazoles sin sustituir en la posición 5, los resultados obtenidos indican que únicamente los derivados **3**, **6** y **29** no presentan actividad agonista significativa, al igual que el 5-bromoindazol **37** (Fig. 34). Por otra parte, el 5-aminoderivado **35** se comporta como un agonista parcial (Fig. 33).

Sin embargo, hay que resaltar que algunos de estos derivados, fundamentalmente los 1-alquilderivados **3**, **9**, **18**, **23** y **24** se comportan como antagonistas cannabinoides, inhibiendo el efecto del WIN55212-2. Este aspecto, aún siendo muy relevante, no se contempla en los objetivos de la presenta memoria, enfocada a la aplicación de soluciones terapéuticas para las enfermedad de Alzheimer, y por tanto no va a ser discutido.

En la figura 32 se muestran las gráficas de los derivados de indazol más interesantes que muestran un comportamiento de agonista total (*full* agonistas), que corresponden a los derivados de 1-piperidinoetil **4** y **31**, de 1-(N-pirrolidinil)etil **30** y de 1-diisopropilaminoetil **32** en los éteres sin sustituir en posición 5. Análogamente, los 5-aminoindazoles **34** y **36** también se comportan como “*full*” agonistas.

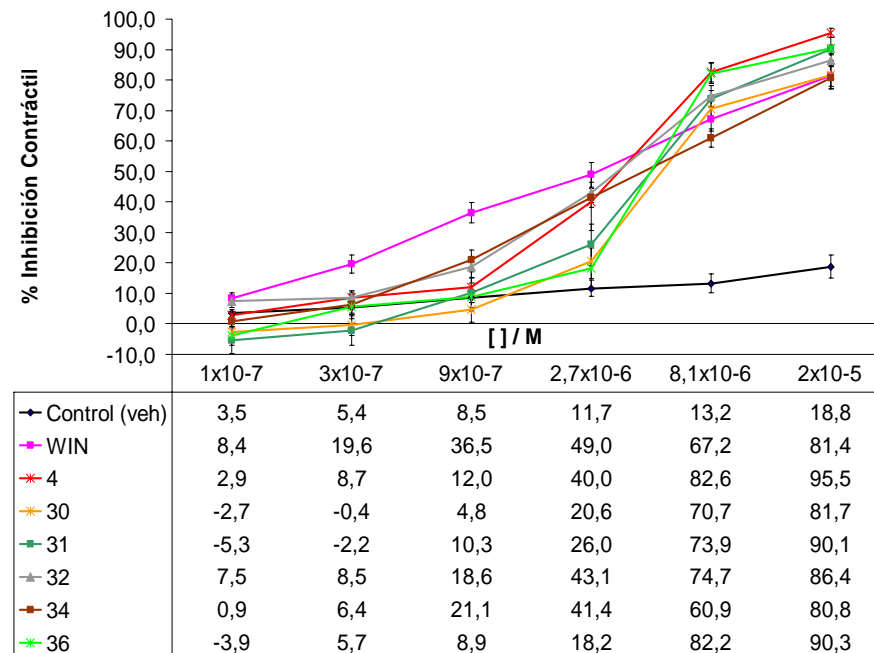


Figura 32. Representación gráfica del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil del agonista de referencia WIN55212-2 y de los compuestos sintetizados que han mostrado un efecto completo (*full* agonistas).

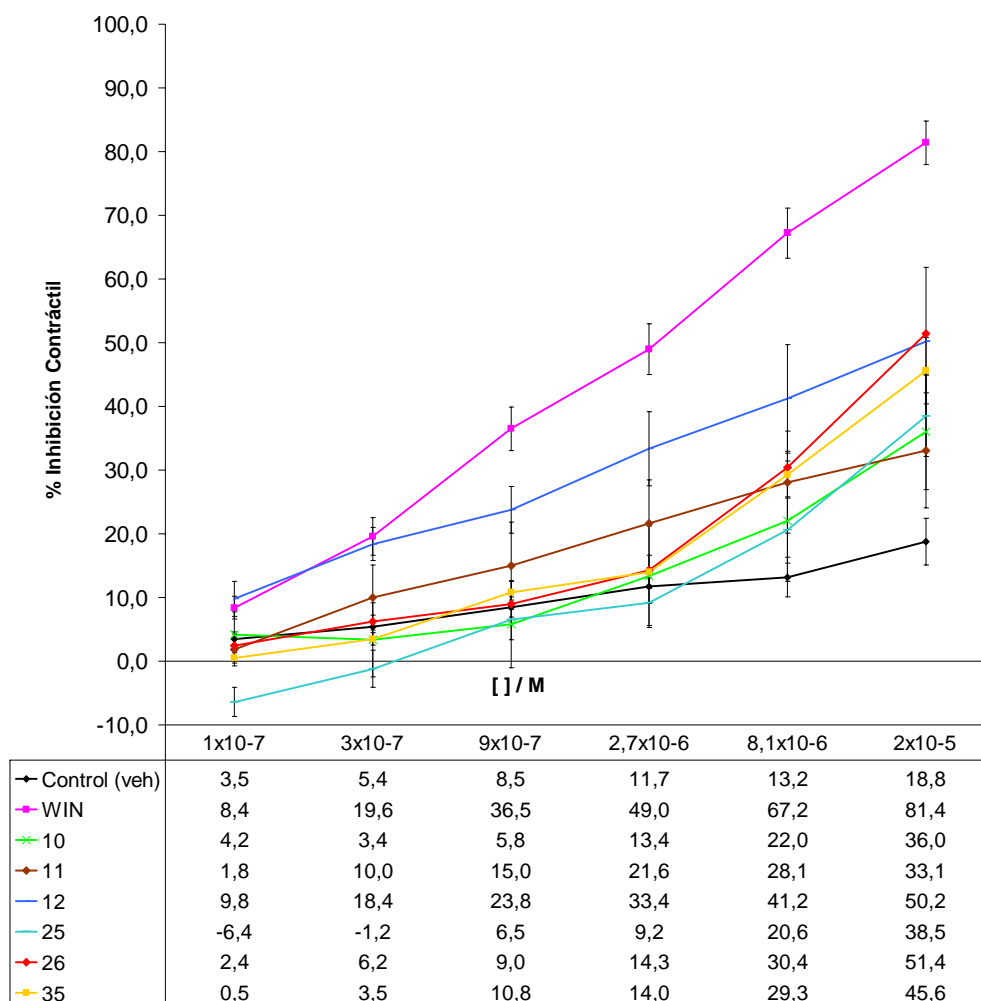


Figura 33. Representación gráfica del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil del agonista de referencia WIN55212-2 y de los compuestos sintetizados que han mostrado un efecto parcial (agonistas parciales).

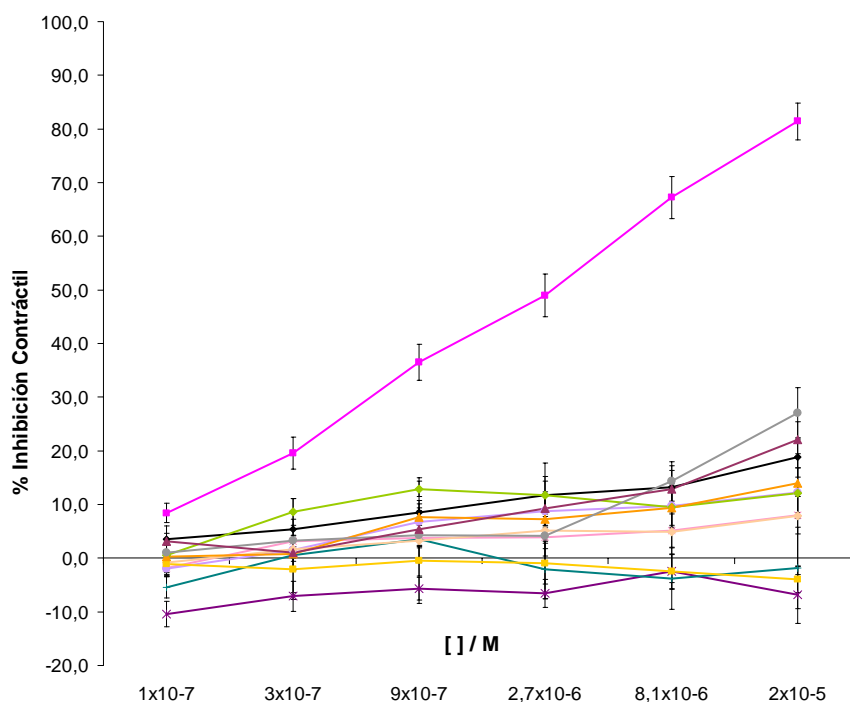


Figura 34. Representación gráfica del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil del agonista de referencia WIN55212-2 y de los compuestos sintetizados que no han mostrado efecto agonista.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que han sido obtenidos seis derivados de éteres de indazol (**4**, **30**, **31**, **32**, **34** y **36**) con un importante efecto agonista (inhibición de las contracciones inducidas eléctricamente), dependiente de la concentración y con una efectividad similar a la del agonista cannabinoide de referencia WIN55212-2 (Fig. 35).

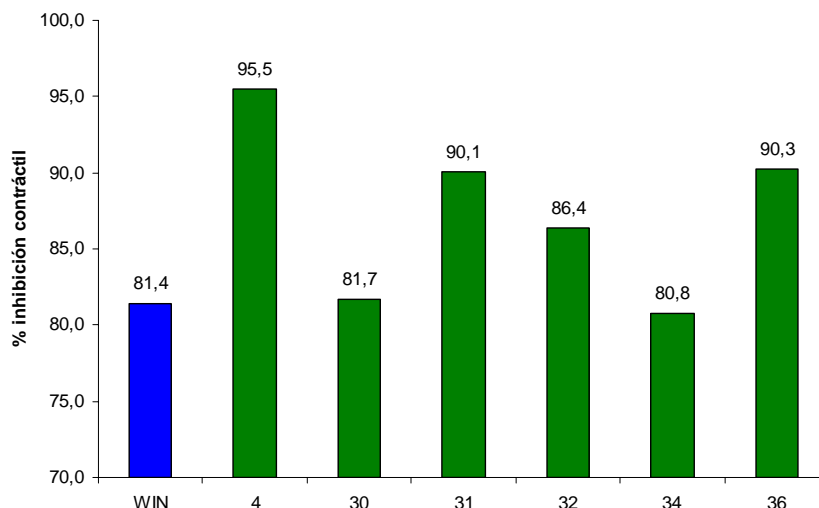


Figura 35. Efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil a la concentración máxima ensayada ($2,0 \times 10^{-5}$) de los derivados **4**, **30**, **31**, **32**, **34**, **36** y del compuesto de referencia WIN55212-2.

Con el fin de confirmar que el efecto producido es consecuencia de la interacción con los receptores cannabinoides, se han realizado estudios complementarios, que consisten en determinar si el efecto producido por los derivados de indazol es bloqueado por los antagonistas selectivos CB₁ (AM251) y/o CB₂ (AM630). En la figura 36 se representan en un diagrama de barras los resultados obtenidos correspondientes a la evaluación de los derivados de indazol **4**, **31**, **32** y **34**. Las columnas verdes muestran el porcentaje de inhibición de la contracción inducida eléctricamente en tejido de vaso deferente de ratón provocada por la adición del éter de indazolilo a estudiar. Las columnas rojas muestran el porcentaje de inhibición causado por la adición conjunta de cada compuesto con el antagonista CB₁ AM251, mientras que las columnas azules muestran el porcentaje de inhibición causado por la adición, junto con el derivado estudiado, de ambos antagonistas (AM251 y AM630) a la vez. Ambos antagonistas se utilizaron a la concentración de 10^{-6} M.

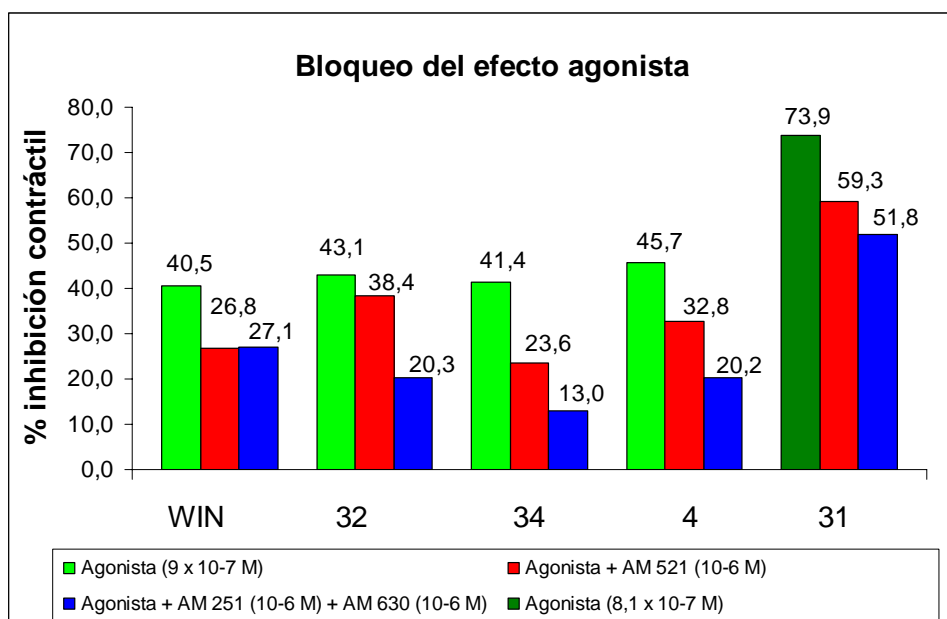


Figura 36. Reversión del efecto agonista de los compuestos WIN55212-2, **4**, **31**, **32** y **34** provocada por los antagonistas CB1 y CB2 respectivamente AM251 y AM630.

Como se puede observar en la figura 36, el efecto causado por los compuestos sintetizados es bloqueado bien por la adición del antagonista selectivo CB1, el AM251, o bien por la suma de ambos (AM251 y AM630), de manera similar al compuesto de referencia WIN55212-2, lo que demuestra claramente el hecho de que el efecto observado tras la adición de estos compuestos es mediado por los receptores cannabinoides.

A modo de conclusión, se puede afirmar que los compuestos **4**, **31**, **32** y **34** tienen, de entre todos los derivados ensayados, el mejor perfil como agonistas cannabinoides, ya que inhiben de forma eficaz y de una forma dependiente de la concentración, las contracciones inducidas eléctricamente en tejido deferente de ratón, siendo además este efecto bloqueado por la presencia de antagonistas CB1 y CB2, en la misma medida que el agonista cannabinoide de referencia WIN55212-2.

6.2. EFECTO COLINÉRGICO

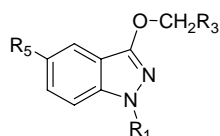
Ensayos de Inhibición Enzimática

Para estudiar el posible efecto colinérgico de los nuevos compuestos y con el fin de su posible aplicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, se realizaron ensayos de inhibición enzimática sobre las enzimas acetil- y butirilcolinesterasa (AChE y BuChE) siguiendo el método descrito por Ellman *et al.*¹²⁵, usando donepezilo y rivastigmina, fármacos utilizados contra la EA, como compuestos de referencia.

En la tabla 11 se presentan los datos de la IC₅₀ de todos los derivados de éteres de indazolilo sintetizados. La IC₅₀ se define como la concentración de compuesto que inhibe la actividad enzimática un 50% con respecto al control de la enzima sin tratamiento. Hay que señalar que, desgraciadamente, no fue posible la determinación de la IC₅₀ para muchos de los derivados evaluados por razones de solubilidad.

Como se puede observar en la tabla 11, los derivados **4**, **10**, **26**, **29**, **30**, **31**, **32**, **34**, **36** y **37** muestran inhibición de la enzima butirilcolinesterasa (BuChE) con un valor de IC₅₀ del mismo orden que la rivastigmina. De entre estos derivados, los compuestos **26**, **29**, **31**, **32** y **36** son los que mostraron además cierta actividad como inhibidores de la AChE.

Tabla 11. Datos de IC₅₀ de los compuestos estudiados frente a las enzimas hAChE y hBuChE.



Compuesto	R ₅	R ₁	R ₃	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
1	H	H	4-metoxifenilo	>10 (30,81±4,68)	>10
2	H	H	2-naftilo	> 10 (34,87 ± 1,35)	> 10
3	H	metilo	2-naftilo	> 10 (40,07 ± 6,46)	10 (20,39 ± 2,81)
4	H	piperidinoetilo	2-naftilo	> 10 (15,78 ± 2,78)	0,97 ± 0,02
5	H	bencilo	fenilo	2,87 ± 1,76	> 25
6	H	4-metoxibencilo	4-metoxifenilo	> 10 (37,64 ± 6,29) ^b	> 10
7	NO ₂	H	4-metoxifenilo	> 10 (35,00 ± 3,03)	> 10
8	NO ₂	H	2-naftilo	8,62 ± 0,01	> 10
9	NO ₂	metilo	2-naftilo	> 10 (39,70 ± 5,35)	> 10
10	NO ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	> 10	3,58 ± 0,10
11	NO ₂	bencilo	fenilo	7,28 ± 0,25	> 10
12	NO ₂	bencilo	2-naftilo	6,34 ± 0,52	> 10
18	NO ₂	metilo	1-naftilo	> 10 (43,23 ± 6,59)	> 10
21	NO ₂	H	1-naftilo	13,08 ± 1,22	> 25
22	H	H	1-naftilo	> 10 (27,70 ± 1,36)	> 10
23	NO ₂	propilo	4-metoxifenilo	> 10 (45,37 ± 3,24)	> 10
24	NO ₂	pentilo	2-naftilo	8,19 ± 0,49	> 10
25	NO ₂	morfolinoetilo	2-naftilo	> 10 (18,21 ± 0,15)	> 10
26	NO ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	>25 (45± 2,24)	4,51 ± 1,71
27	NO ₂	pentilo	4-metoxifenilo	9,74 ± 0,21	> 10
28	NO ₂	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	91,12 ± 2,13	> 100
29	H	N-diisopropilaminoetilo	1-naftilo	> 10 (32,00 ± 0,43)	0,10 ± 0,03
30	H	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	> 10	2,83 ± 0,01
31	H	piperidinoetilo	1-naftilo	> 10 (45,68 ± 4,91)	0,81 ± 0,02
32	H	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	> 10 (24,44 ± 2,55)	4,76 ± 0,34
33	NH ₂	bencilo	fenilo	8,64 ± 0,49	> 10 (21,07 ± 2,03)
34	NH ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	> 10 (13,3 ± 4,3)	1,78 ± 0,01
35	NH ₂	propilo	2-naftilo	> 10 (36,63 ± 1,53)	> 10
36	NH ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	>25 (41%)	3,03 ± 0,86
37	Br	piperidinoetilo	2-naftilo	> 10	0,19 ± 0,01
rivastigmina				48,0 ^d	54,0 ^d
donepezilo				0,010 ± 0,002	2,5 ± 0,07 ^c

^aDosis máxima ensayada; ^bEntre paréntesis el porcentaje de inhibición a esa concentración; ^cK_i experimental en BuChE de suero equino; ^dReferencia¹²⁶

Hay que señalar que, únicamente los compuestos con un sustituyente de dialquilaminoetilo en la posición 1 del sistema de indazol, muestran actividad como inhibidores de BuChE. No obstante, este requerimiento no es suficiente por sí sólo, ya que los 5-nitroderivados **25** y **28** no mostraron actividad inhibidora.

En la tabla 11 se observa además que, en relación a la AChE, los derivados N1-H **8** y **21**, N1-benzil **5**, **11**, **12** y **33** o N1-alkilderivados **24** y **27**, mostraron actividad del orden micromolar como inhibidores de AChE. Sin embargo, todos estos derivados no tienen actividad como inhibidores de BuChE.

A partir de un sencillo análisis de los datos mostrados en la tabla 11, se puede deducir que la sustitución en la posición 1 del anillo de indazol por un grupo del tipo dialquilaminoetilo es condición necesaria para mostrar actividad inhibidora de la butirilcolinesterasa (BuChE).

Estudios de competición

Para los compuestos agonistas cannabinoides que mostraron un efecto inhibidor hacia las enzimas BuChE y/o AChE, y con el fin de determinar el modo de inhibición de éstos, se realizaron estudios de competición, para establecer si el mecanismo de inhibición es de tipo competitivo, no competitivo o mixto.

La inhibición competitiva también llamada “inhibición por afinidad” consiste en la competición por parte del inhibidor y del sustrato natural por el mismo centro activo de la encima (Fig. 37), mientras que en la inhibición no competitiva o “inhibición sin afinidad”, el inhibidor no se une al centro activo de la enzima sino a algún otro lugar de la misma (centros alostéricos) (Fig. 38). Dentro de la inhibición no competitiva, se encuentra la inhibición mixta, donde el inhibidor puede unirse tanto al complejo enzima-sustrato como a la enzima. En sentido práctico, dependiendo de la orientación y disposición del inhibidor, puede o no competir con el sustrato natural.

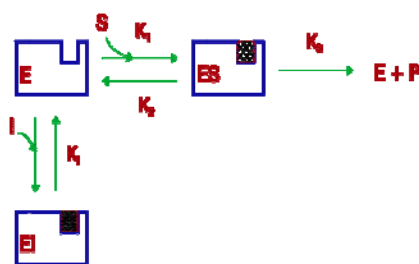


Figura 37. Esquema representativo del modo de inhibición competitivo.

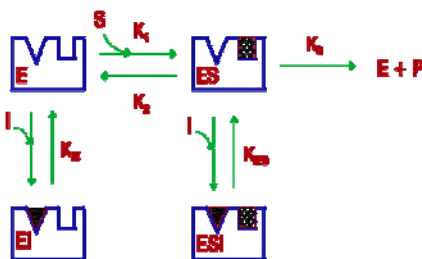


Figura 38. Esquema representativo del modo de inhibición no competitiva.

En el caso concreto de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), como ya se comentó en el capítulo 2, el distinto tipo de inhibición que ejercen los compuestos inhibidores de estas enzimas, está directamente relacionado con el sitio de unión de los mismos a la enzima. Así, un compuesto que interaccione con la enzima en el centro activo CAS, ejercerá una inhibición de tipo competitivo, mientras que una cinética de inhibición no competitiva indica que el compuesto se une al sitio periférico (PAS) sin afectar a la afinidad del sustrato natural por la enzima. Por su parte un modo de inhibición mixto, indica que la unión del compuesto al sitio periférico PAS, dificulta de algún modo la interacción del sustrato natural con el centro catalítico de la enzima^{214, 215}.

Por ello, se ha llevado a cabo una evaluación del mecanismo de acción sobre ambas enzimas, AChE y BuChE, para los derivados sintetizados que han presentado un porcentaje significativo de inhibición, por medio de un análisis de su cinética¹²⁷⁻¹²⁹.

Las representaciones Lineweaver-Burk obtenidas tanto para los indazoles estudiados como para el donepezilo¹²⁹, usado como compuesto de referencia, se muestran en las figuras 39 y 40 (BuChE y AChE, respectivamente). Así, se llevaron a cabo estudios de competición sobre la enzima BuChE, con los derivados **4**, **10**, **26**, **29**, **30**, **31**, **32**, **34**, **36** y **37**, para determinar el tipo de inhibición (Fig. 39).

La representación gráfica de Lineweaver-Burk para la inhibición causada por el donepezilo sobre la BuChE, muestra un aumento, tanto de la pendiente como de la ordenada en el origen, al aumentar la concentración del inhibidor (Fig. 39). Este patrón indica una inhibición de tipo mixta, estando de acuerdo con resultados previos publicados para el donepezilo¹²⁹. El significado físico de la inhibición mixta mostrada por el donepezilo, sugiere que este compuesto se une a un sitio distinto del centro activo, es decir al sitio periférico (PAS), pero que, de algún modo, afecta a la unión del sustrato natural al centro catalítico CAS. Analizando las gráficas obtenidas para los compuestos **10** y **34** se observa que presentan un patrón de inhibición semejante al del donepezilo, es decir inhiben a la BuChE de un modo mixto. Por su parte, los derivados **26**, **29**, **30**, **31**, **36** y **37** presentan un patrón de inhibición tipo competitivo. En cambio, la gráfica recogida en la figura 39 correspondiente a los derivados **4** y **32**, indica que el tipo de inhibición causada por estos compuestos se realiza de un modo no competitivo, deduciéndose que estos derivados no compiten con el sustrato por el centro activo CAS.

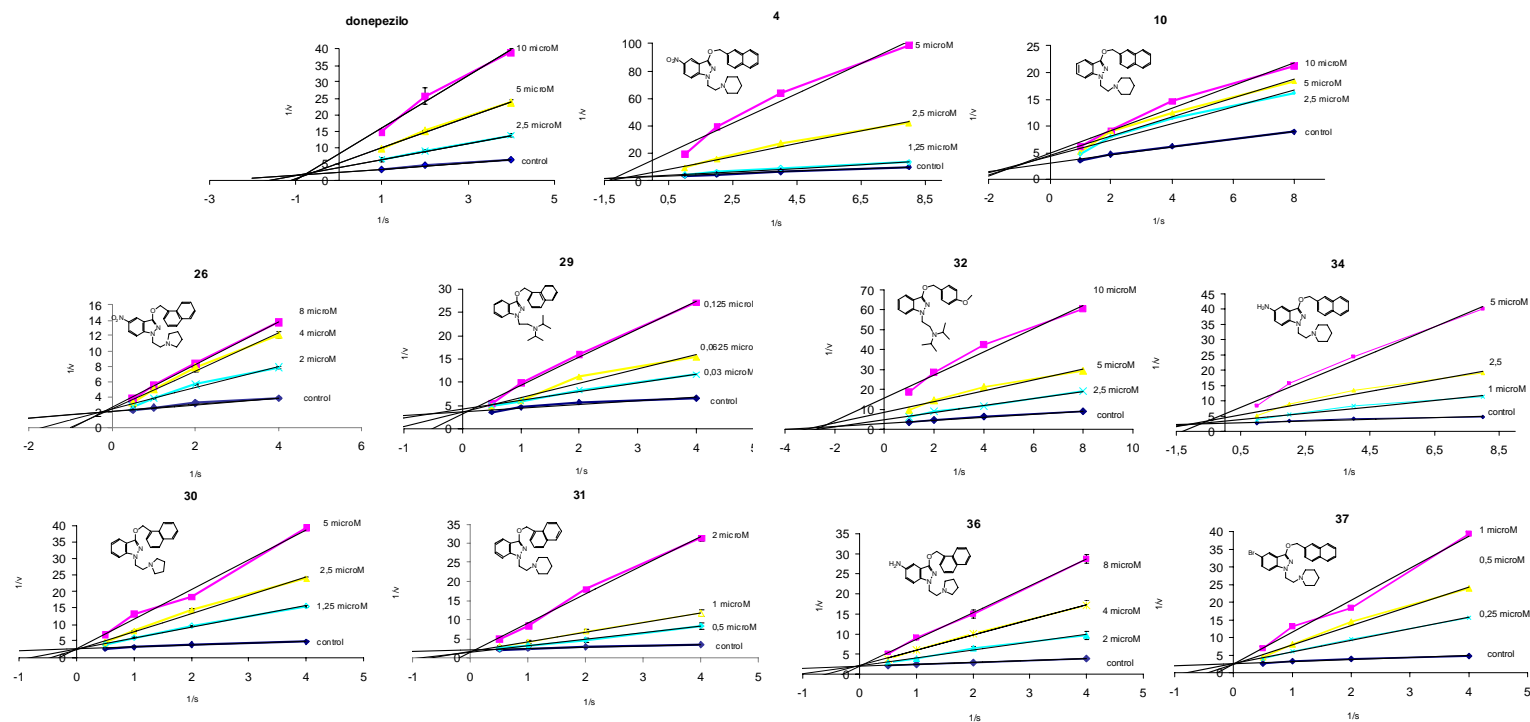


Figura 39. Representación gráfica de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima BuChE causada por el donepezilo y los derivados **4**, **10**, **26**, **29**, **30**, **31**, **32**, **34**, **36** y **37**. Actividad enzimática (v) expresada como $\text{min } \mu\text{M}^{-1}$.

De una manera similar a la realizada para la BuChE, se llevaron a cabo estudios de competición sobre la enzima AChE de los derivados de indazol con actividad inhibidora de la BuChE. Por tanto, únicamente, se estudiaron los derivados **29** y **31** (Fig. 40), que presentan cierta actividad significativa como inhibidores de AChE.

Al igual que en el caso de la butirilcolinesterasa (BuChE), en la representación gráfica de Lineweaver-Burk para la inhibición ejercida por el donepezilo sobre la acetilcolinesterasa (AChE), se observa un aumento tanto de la pendiente como de la intersección con en el eje X al aumentar la concentración del inhibidor (Fig. 40). Este patrón indica una inhibición de tipo mixto, concordante con los datos de la bibliografía¹²⁹. El derivado **31** muestra un perfil similar al donepezilo, lo que demuestra el carácter mixto de su efecto inhibitorio mientras que el perfil del compuesto **29** muestra una inhibición de tipo competitiva.

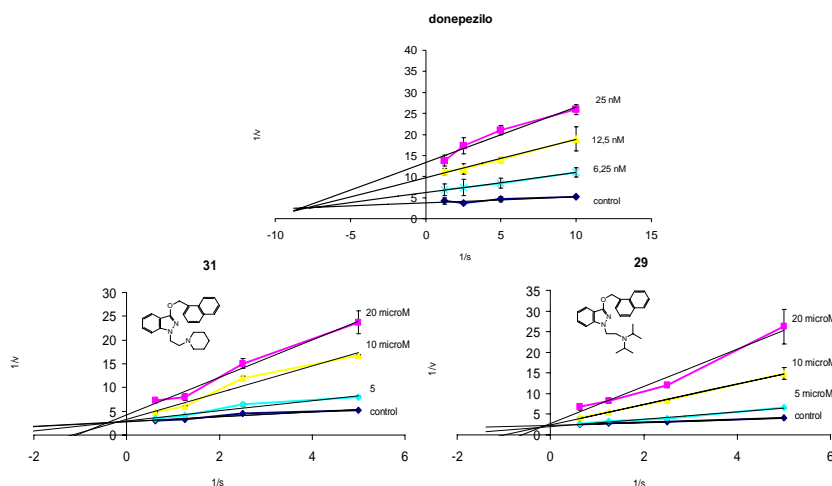
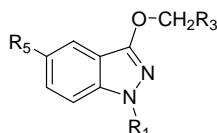


Figura 40. Representación gráfica de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima AChE causada por el donepezilo y los derivados **29** y **31**. Actividad enzimática (v) expresada como $\text{min } \mu\text{M}^{-1}$.

En conclusión, se han caracterizados una serie de compuestos que se comportan como inhibidores de la BuChE de tipo mixto (**10** y **34**), no competitivo (**4** y **32**) y competitivo (**26**, **29**, **30**, **31**, **36** y **37**). De ellos, los derivados **29** y **31** tienen también actividad como inhibidores de la enzima AChE, de tipo mixto y competitivo, respectivamente. En la tabla 12, se resumen los tipos de inhibición encontrados para los compuestos sintetizados inhibidores de BuChE.

Tabla 12: Resumen de los tipos de inhibición de los compuestos ensayados.



Compuesto	R ₅	R ₁	R ₃	AChE	BuChE
4	H	piperidinoetilo	2-naftilo	Competitivo	No Competitivo
10	NO ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	ND ^a	Mixto
26	NO ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	ND	Competitivo
29	H	N-diisopropilaminoetilo	1-naftilo	ND	Competitivo
30	H	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	ND	Competitivo
31	H	piperidinoetilo	1-naftilo	Mixto	Competitivo
32	H	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	ND	No Competitivo
34	NH ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	ND	Mixto
36	NH ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	ND	Competitivo
37	Br	piperidinoetilo	2-naftilo	ND	Competitivo
donepezilo				Mixto	Mixto

ND^a: No Determinado, por carecer de actividad inhibidora significativa

6.3. EFECTO NEUROPROTECTOR ANTIOXIDANTE

Para completar el estudio farmacológico de esta nueva familia de compuestos, se realizaron algunos ensayos adicionales para los compuestos más interesantes, referentes a la determinación de sus propiedades antioxidantes.

Ensayos de oxidación. Método ORAC

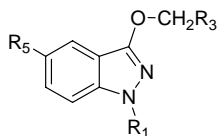
Una característica deseable en fármacos con posible aplicación médica en el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas, es la capacidad de ejercer un efecto antioxidante, ya que una de las causas que provocan y aumentan los daños neuronales es la existencia de daños oxidativos. Para el estudio de las propiedades antioxidantes de estos compuestos, se realizaron ensayos ORAC con el fin de determinar la capacidad de proteger las células de posibles procesos oxidativos. Para ello se siguió el método ORAC-FL de Ou *et al.*²¹⁶ parcialmente adaptado por BMG LABTECH²¹⁷ (ver parte experimental, sección 10.2).

En este ensayo se mide la pérdida de fluorescencia de una molécula (en este caso, la fluoresceína) al añadir a la disolución de ensayo un agente generador de radicales libres (AAPH), que destruyen la molécula fluorescente, ocasionando una disminución de la fluorescencia observada. El proceso de pérdida de fluorescencia, se ve ralentizado con el uso de agentes antioxidantes, usándose como referencia un análogo de la vitamina E (trolox). Así, la medida de la fluorescencia al añadir cada uno de los compuestos a la disolución de ensayo, nos da un valor cuantitativo de la capacidad antioxidante de los compuestos ensayados en unidades de trolox.

En la parte experimental (sección 10.2d) se explica en mayor detalle el procedimiento seguido. La tabla 13 recoge los resultados obtenidos en el ensayo de oxidación para los derivados de indazol con propiedades cannabinoides y con actividad como inhibidores de la butirilcolinestasa (BuChE).

Como se puede observar en la tabla 13, la mayoría de los derivados seleccionados poseen propiedades antioxidantes, salvo en el caso de los 5-nitroderivados **10** y **26**. De entre todos ellos hay que destacar los compuestos **32**, **34** y **36**, que añaden a sus cualidades de *full* agonista cannabinoide y de inhibición de la enzima BuChE, una muy interesante actividad antioxidante.

Tabla 13. Datos de oxidación, en unidades de trolox, de los compuestos cannabinoides inhibidores de BuChE.



Compuesto	R ₅	R ₁	R ₃	ORAC (unidades de trolox)
4	H	piperidinoetilo	2-naftilo	0,5
10	NO ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	0
26	NO ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	0
29	H	N-diisopropilaminoetilo	1-naftilo	0,82
30	H	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	0,67
31	H	piperidinoetilo	1-naftilo	0,45
32	H	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	0,95
34	NH ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	0,79
36	NH ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	1,29
37	Br	piperidinoetilo	2-naftilo	0,29

6.4. TOXICIDAD

Test de Ames

Para evaluar la toxicidad de esta familia de compuestos, se realizaron sobre varios compuestos, estudios de toxicidad en células mediante el Test de Ames²¹⁸, un ensayo biológico donde, mediante la utilización de cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* con mutaciones en los genes implicados en la síntesis de histidina (His) (aminoácido esencial para su supervivencia), se pone a prueba la capacidad mutagénica del compuesto a ensayar, mediante la medición del número de colonias que sobreviven en un medio carente de His, ya que el hecho de que las bacterias sobrevivan en esas condiciones, se traduce en que éstas han mutado para poder sintetizar la histidina (His) necesaria (ver parte experimental, sección 10.2). Además, se realiza el mismo ensayo en un medio

donde se añade un sistema metabólico (S9mix), con el fin de analizar la mutagenicidad de posibles metabolitos de los compuestos.

Los estudios se realizaron en tres derivados representativos de los indazoles *multitarget* obtenidos, como el N1-pirrolidiniletil **30**, el N1-piperidinoetil **31**, y el 5-amino **34** (ver parte experimental, sección 10.2, tabla 22). Los resultados negativos obtenidos tanto en el ensayo en condiciones estándar como en el ensayo con el sistema metabólico S9mix, indican que tanto los compuestos ensayados como los productos resultantes de su posible metabolismo no son mutagénicos.

6.5. CONCLUSIONES

Después de analizar los resultados de los estudios de farmacología realizados con estos compuestos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

Efecto cannabinoide

-La mayoría de los compuestos preparados, previamente diseñados mediante modelización en el modelo del receptor CB2, han mostrado la capacidad de unirse a los receptores cannabinoides.

-Los estudios en tejido han puesto de manifiesto que los diferentes derivados de indazol se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su comportamiento farmacológico: a) antagonistas, b) agonistas parciales y c) “*full* agonistas”. Dentro de este último grupo hay que destacar los derivados **4**, **30**, **31**, **32**, **34** y **36**, ya que presentan un efecto del mismo orden que el agonista de referencia WIN55212-2.

- En cuanto a la selectividad CB2, los compuestos **31** y **34** son los que presentan mayores ratios.

Efecto colinérgico

- Los estudios de inhibición en AChE / BuChE han demostrado que todos los derivados “full agonistas” **4**, **30**, **31**, **32**, **34** y **36**, son inhibidores de la enzima BuChE.

- Los estudios de competición enzimática han demostrado que, dentro del grupo de los full agonistas, los éteres de 1-naftilindazol **30**, **31** y **36** se comportan como inhibidores de la BuChE de tipo competitivo, el derivado **34** inhibe de una manera mixta y los derivados **4** y **32** lo hacen de modo no competitivo.

- El agonista cannabinoide **31**, se comporta no sólo como inhibidor de la enzima BuChE, sino que además presenta actividad como inhibidor de la enzima AChE.

- Hay que resaltar que, los derivados **4**, **32** y **34** se unen a la BuChE en el PAS, lo que se deduce por su tipo de inhibición no competitiva, lo que les confiere un interés suplementario.

Efecto Neuroprotector Antioxidante

- Todos los “full agonistas” cannabinoides inhibidores de BuChE muestran propiedades antioxidantes. De entre todos ellos, hay que destacar los inhibidores **32** (no competitivo) y **36** (competitivo). Este último presenta una capacidad antioxidante un 29% mayor que el compuesto de referencia trolox.

Toxicidad

- Finalmente destacar que los compuestos evaluados no mostraron mutagenicidad de acuerdo con el test de Ames.

7. ESTUDIOS DE *DOCKING*

7.1. ESTUDIOS DE LOS COMPLEJOS CB2R - ÉTERES DE INDAZOL.

7.2. ESTUDIOS DE LOS COMPLEJOS BUCHE Y/O ACHE-ÉTERES DE INDAZOL.

Complejos éteres de indazol – BuChE.

Complejos éteres de indazol – AChE.

7.3. CONCLUSIONES.

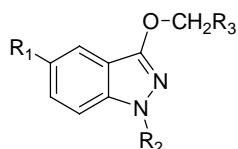
Tal y como ha sido descrito en el capítulo 4, la elección de los éteres de indazol como compuestos de estudio, fue realizada en base a la analogía tridimensional con los aminoalquilindoles (AAls), así como a los estudios de anclaje con el modelo de receptor CB2. Para ello, se desarrolló un modelo tridimensional del receptor CB2 mediante técnicas de homología que, tras sucesivas modificaciones, permitió establecer una buena concordancia con los resultados experimentales relativos a las interacciones más importantes escritas en los agonistas más estudiados (WIN55212-2, JWH-015, etc) así como con la predicción de los valores de afinidad de potenciales ligandos cannabinoides como los indazoles. En la tabla 14, se muestran los valores teóricos y experimentales de K_d obtenidos para los complejos de los éteres de indazol sintetizados y el receptor CB2.

Por otra parte, los estudios farmacológicos expuestos en el capítulo anterior han mostrado que varios de estos derivados son agonistas CB2 e inhibidores de la BuChE y/o AChE. De entre ellos, cabe destacar los inhibidores de butirilcolinesterasa (BuChE) de tipo competitivo **26**, **30**, **31** y **36**, de tipo no competitivo **4** y **32** y los inhibidores mixtos **10** y **34**.

Estos derivados se pueden considerar como compuestos líderes o *hits* ya que son ligandos multifuncionales, al presentar actividad agonista cannabinoide, actividad inhibitoria sobre la BuChE y capacidad antioxidante en algunos casos y por tanto con una gran potencialidad para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En la tabla 15, se resumen los datos farmacológicos más interesantes de estos derivados.

Teniendo en cuenta esta información y con el fin de conocer con mayor detalle el modo de unión de estos compuestos, se han estudiado en mayor profundidad estos derivados, mediante estudios de anclaje con el modelo de receptor CB2, así como con las enzimas AChE y BuChE.

Tabla 14. Resultados obtenidos en los ensayos de desplazamiento de radioligando y en los estudios de *docking*.



Nº	R ₅	R ₁	R ₃	K _i CB2 exper. (µM)	K _d CB2 teor. (µM)
1	H	H	4-metoxifenilo	4,49 ± 0,81	1,6
2	H	H	2-naftilo	6,83 ± 1,59	7,1
3	H	metilo	2-naftilo	10,1 ± 2,4	3,0
4	H	piperidinoetilo	2-naftilo	2,01 ± 1,47	4,0
5	H	bencilo	fenilo	3,51 ± 0,09	2,3
6	H	4-metoxibencilo	4-metoxifenilo	0,913 ± 0,230	1,9
7	NO ₂	H	4-metoxifenilo	1,81 ± 0,17	1,0
8	NO ₂	H	2-naftilo	5,17 ± 1,18	2,7
9	NO ₂	metilo	2-naftilo	3,50 ± 2,57	1,5
10	NO ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	0,508 ± 0,130	0,6
11	NO ₂	bencilo	fenilo	0,388 ± 0,103	0,8
12	NO ₂	bencilo	2-naftilo	0,414 ± 0,191	0,9
18	NO ₂	metilo	1-naftilo	0,254 ± 0,063	0,3
21	NO ₂	H	1-naftilo	0,919 ± 0,245	1,8
22	H	H	1-naftilo	0,439 ± 0,084	1,8
23	NO ₂	propilo	4-metoxifenilo	0,47 ± 0,04	4,7
24	NO ₂	pentilo	2-naftilo	1,37 ± 0,06	1,2
25	NO ₂	morfolinoetilo	2-naftilo	0,544 ± 0,217	0,8
26	NO ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	0,132 ± 0,019	2,9
27	NO ₂	pentilo	4-metoxifenilo	0,487 ± 0,056	2,3
28	NO ₂	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	8,87 ± 2,16	0,7
29	H	N-diisopropilaminoetilo	1-naftilo	5,40 ± 0,90	0,5
30	H	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	0,370 ± 0,190	2,3
31	H	piperidinoetilo	1-naftilo	0,238 ± 0,050	3,7
32	H	N-diisopropilaminoetilo	4-metoxifenilo	7,68 ± 2,00	4,0
33	NH ₂	bencilo	fenilo	1,65 ± 0,29	1,3
35	NH ₂	propilo	2-naftilo	2,90 ± 0,70	2,2
34	NH ₂	piperidinoetilo	2-naftilo	2,35 ± 1,36	1,5
36	NH ₂	N-pirrodiniletilo	1-naftilo	4,64 ± 1,5	3,7
37	Br	piperidinoetilo	2-naftilo	1,81 ± 0,73	0,6
WIN55212-2				0,036 ± 0,005	52,0

Tabla 15. Datos teóricos, experimentales y farmacológicos de los derivados sintetizados con propiedades de agonistas cannabinoides e inhibidores de butirilcolinesterasa (BuChE) (**4**, **10**, **26**, **30**, **31**, **32**, **34**, y **36**).

Nº	K _i CB2 Exp. (µM)	K _i CB1 Exp. (µM)	K _d CB2 teórica	IC ₅₀ hAChE (µM)	hAChE K _d teor.	IC ₅₀ hBuChE (µM)	hBuChE K _d pred.	Tipo de inhibición hBuChE ^b	Oxidación (uds. trolox)
4	2,01 ± 1,47	1,42 ± 0,54	6,6 x 10 ⁻⁶	>10	1,9 x 10 ⁻³	0,970 ± 0,015	7,2 x 10 ⁻⁷	NC	0,5
10	0,508 ± 0,130	1,26 ± 0,43	0,6 x 10 ⁻⁶	>10	1,5 x 10 ⁻⁵	3,58 ± 0,10	4,4 x 10 ⁻⁷	M	0
26	0,132 ± 0,019	0,618 ± 0,148	2,9 x 10 ⁻⁶	>25 (45) ^a	2,2 x 10 ⁻⁴	4,51 ± 1,71	3,1 x 10 ⁻⁷	C	0
30	0,370 ± 0,190	0,564 ± 0,086	2,3 x 10 ⁻⁶	>10	3,2 x 10 ⁻⁴	2,830 ± 0,013	1,0 x 10 ⁻⁶	C	0,67
31	0,238 ± 0,050	3,19 ± 1,6	3,9 x 10 ⁻⁶	>10 (45,68 ± 4,91) ^a	6,2 x 10 ⁻⁷	0,810 ± 0,016	4,4 x 10 ⁻⁷	C	0,45
32	7,68 ± 2,00	>40	4,0 x 10 ⁻⁶	>10	2,4 x 10 ⁻⁶	4,76 ± 0,34	3,5 x 10 ⁻⁶	NC	0,95
34	2,35 ± 1,36	>40	0,7 x 10 ⁻⁶	>10	5,9 x 10 ⁻³	1,78 ± 0,01	4,8 x 10 ⁻⁷	M	0,79
36	4,64 ± 1,5	1,13 ± 0,29	3,7 x 10 ⁻⁶	>25 (41%) ^a	3,2 x 10 ⁻⁴	3,03 ± 0,86	3,1 x 10 ⁻⁷	C	1,29
WIN55212-2	0,007 ± 0,002	0,036 ± 0,005	5,2 x 10 ⁻⁵	>100	2,1 x 10 ⁻⁴	>100	3,6 x 10 ⁻⁵	M	ND ^e
JWH-015	0,014 ± 0,002 ^c	0,164 ± 0,022 ^d	7,7 x 10 ⁻⁵	>15 (35%) ^a	2,5 x 10 ⁻⁵	4,67 ± 0,63	8,1 x 10 ⁻⁶	M	ND ^e

^a% inhibición a esa concentración; ^b Determinada por estudios de competición; C: Competitivo, NC: No Competitivo, M: Mixto; ^cReferencia¹²³;

^dReferencia⁶⁴; ND^e; No Determinada;

7.1.- ESTUDIOS DE LOS COMPLEJOS CB2R - ÉTERES DE INDAZOL.

El estudio de docking se realizó con los derivados de indazol más prometedores, como son **4**, **30**, **31**, **32**, **34** y **36** y con los 5-nitroderivados **10** y **26**, para estudiar la influencia del sustituyente, utilizando como compuesto de referencia el aminoalquilindol JWH-015 (tabla 15).

En primer lugar se construyeron los complejos con cada uno de los ligandos, las cadenas laterales de la proteína y el ligando. Posteriormente se minimizaron estos complejos empleando el campo de fuerzas MMFF94¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ que sirvieron como entrada inicial para los estudios de docking que fueron realizados con el programa FlexiDock^{130, 180} implementado en el paquete de programas SYBYL 7.2.¹³⁰.

Las interacciones clave encontradas para los compuestos **4**, **10**, **26**, **30**, **31**, **32**, **34** y **36** junto con el aminoalquilindol JWH-015, se muestran en la tabla 16. El análisis de estos datos permite obtener información importante con el fin de racionalizar los resultados experimentales.

En la figura 41 se muestra una superposición de las estructuras de los compuestos **4**, **10**, **26**, **30**, **31**, **32**, **34** y **36** y del agonista cannabinoide JWH-015. Se puede observar que estos derivados de indazol ocupan el mismo espacio que el ligando de referencia, mostrando en todos los casos interacciones similares con los residuos del centro activo. La diferencia más notable es el desplazamiento del grupo en posición R₃ debido al reemplazo del grupo carbonilo del JWH-015 por la función éter. Probablemente este desplazamiento provoque un debilitamiento de la interacción aromática del compuesto con los residuos Phe197 y Trp258 del receptor. Como se observa en la figura, este desplazamiento es algo mayor para el caso de los 2-naftilderivados.

Tabla 16. Interacciones clave entre el receptor CB2 y los compuestos JWH015, **4**, **10**, **26**, **30**, **31**, **32**, **34**, y **36**.

	<i>K_i</i> teor. (μ M)	R ₅	Ser112	Thr114	Thr118	Met115	Ala119	Ser161	Ser165	Val164	Phe197	Leu201	Trp258	Met265
4	6,6	H	-	EH (O3)	π indazol-OH	-	-	-	-	VdW	π indazol- π	VdW	π indazol- π	-
10	0,6	NO ₂	-	EH (O3)	π indazol-OH	EH (R ₅ = NO ₂)	EH (R ₅ = NO ₂)	EH (R ₅ = NO ₂)	EH (R ₅ = NO ₂)	VdW	π indazol- π	VdW	π indazol- π	-
26	2,9	NO ₂	π Ar-OH	EH (O3)	π indazol-OH π Ar-HC	EH (R ₅ = NO ₂)	EH (R ₅ = NO ₂)	EH (R ₅ = NO ₂)	EH (R ₅ = NO ₂)	VdW	π indazol- π	VdW	π indazol- π	π Ar-SH
30	2,3	H	-	EH (O3)	π indazol-OH π Ar-HC	-	-	-	-	VdW	π indazol- π	VdW	π indazol- π	π Ar-SH
31	3,9	H	-	EH (O3)	π indazol-OH π Ar-HC	-	-	-	-	VdW	π indazol- π	VdW	π indazol- π	π Ar-SH
32	4,0	H	-	EH (O3)	π indazol-OH	-	-	-	-	VdW	π indazol- π	VdW	-	-
34	0,7	NH ₂	-	EH (O3)	π indazol-OH	-	-	EH (R ₅ = NH ₂)	-	VdW	π indazol- π	VdW	π indazol- π *	-
36	3,7	NH ₂	-	EH (O3)	π indazol-OH π Ar-HC	-	-	EH (R ₅ = NH ₂)	-	VdW	π indazol- π	VdW	π indazol- π	π Ar-SH
JWH-015	77,0			EH (O=C)		π indol-SH*		EH (O=C)		VdW	π indol- π	VdW	π indol- π	π Ar-SH

EH: Enlace de Hidrógeno; *distancia ligeramente superior al valor típico; en rojo los aminoácidos claves para la interacción con agonistas por estudios de mutagénesis; en verde los aminoácidos claves para la interacción con antagonistas por estudios de mutagénesis

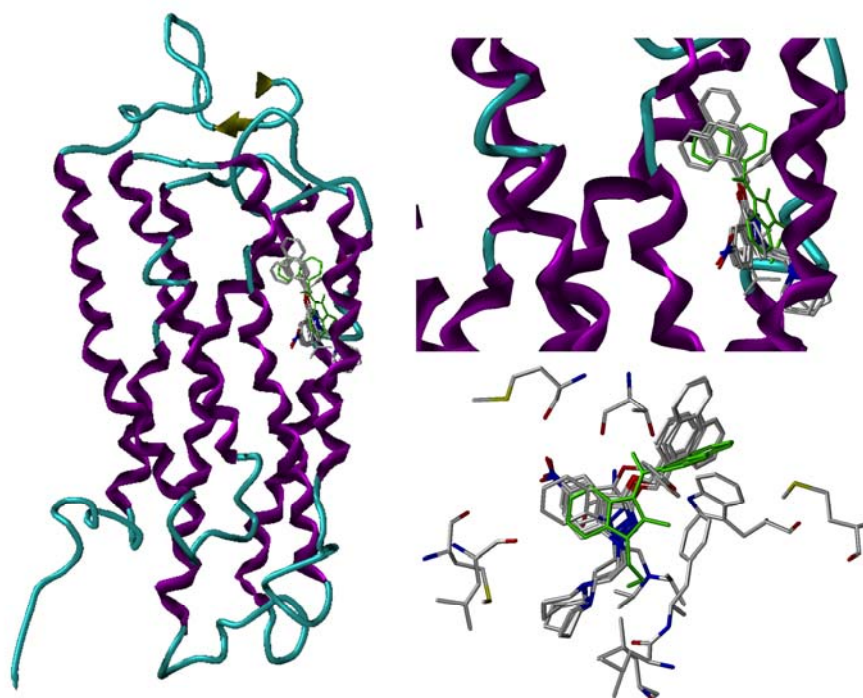


Figura 41. Superposición estructural de los éteres de indazol y JWH-015. El ligando cannabinoide JWH-015 está resaltado en color verde.

Todos los compuestos mostraron interacciones con los aminoácidos Thr114, Thr118, Val164, Phe197, Leu201, Trp258 y Met265 (Fig. 42). Las interacciones que dirigen la unión de los éteres de indazolilo con el centro activo del receptor CB2 son principalmente aromáticas (Phe197, Met115, Thr118) y por puente de hidrógeno (Ala119, Thr118). Hay que resaltar las interacciones aromáticas (π -OH) entre los grupos OH de los residuos treonina (Thr) y serina (Ser) con los anillos aromáticos presentes en los derivados de indazol (Fig. 42). Otras interacciones que se preservan en toda la familia de compuestos son las interacciones hidrófobas tanto con la Val164 como con la Leu201 y del tipo π - π con la Phe197 (Fig. 42). Hay que destacar que los residuos Met115, Ser161, Val164, Phe197 y Leu201, son aminoácidos que mediante estudios de

mutagénesis se ha comprobado que están involucrados en la unión con agonistas como el WIN55212-2¹⁷¹.

Analizando la tabla 16 se puede concluir que, dependiendo del grupo existente en la posición R₃, se establecen diferentes interacciones entre el ligando y la enzima. Así, se observa que las orientaciones de los grupos 1-naftilmetilo y 2-naftilmetilo son distintas, estableciéndose para el primer caso interacciones adicionales con la Met265 (SH-Ar) y con la Thr118 (CH- π_{Ar}), que desaparecen por completo para el complejo con el derivado **32**. Estos datos sugieren que, para poder establecer las interacciones necesarias con los residuos del centro activo de CB2R, es necesaria la existencia de un grupo aromático voluminoso en la posición R₃.

Los compuestos que tienen sustituyente en la posición 5, como los derivados **10**, **26**, **34** y **36**, dependiendo del tipo de sustituyente, presentan interacciones con los residuos Met115, Ala119, Ser161 y Ser165 (Fig. 42). Cuando en la posición R₅ hay un grupo nitro (**10** y **26**) estos compuestos presentan cuatro enlaces de hidrógeno con los residuos Met115, Ala119, Ser161 y Ser165. Hay que mencionar que, mediante estudios de mutagénesis, se ha comprobado que los residuos Ser161 y Ser165 están involucrados en la unión del antagonista SR-144,528^{171, 219}. En el caso de los derivados **10** y **26**, que se comportan como agonistas parciales (ver capítulo 6, figura 33), estos resultados pueden estar sugiriendo que la diferencia de comportamiento farmacológico de estos derivados (agonismo *vs* agonismo parcial), se podría explicar por la interacción con los residuos Met115, Ala119, Ser161 y Ser165.

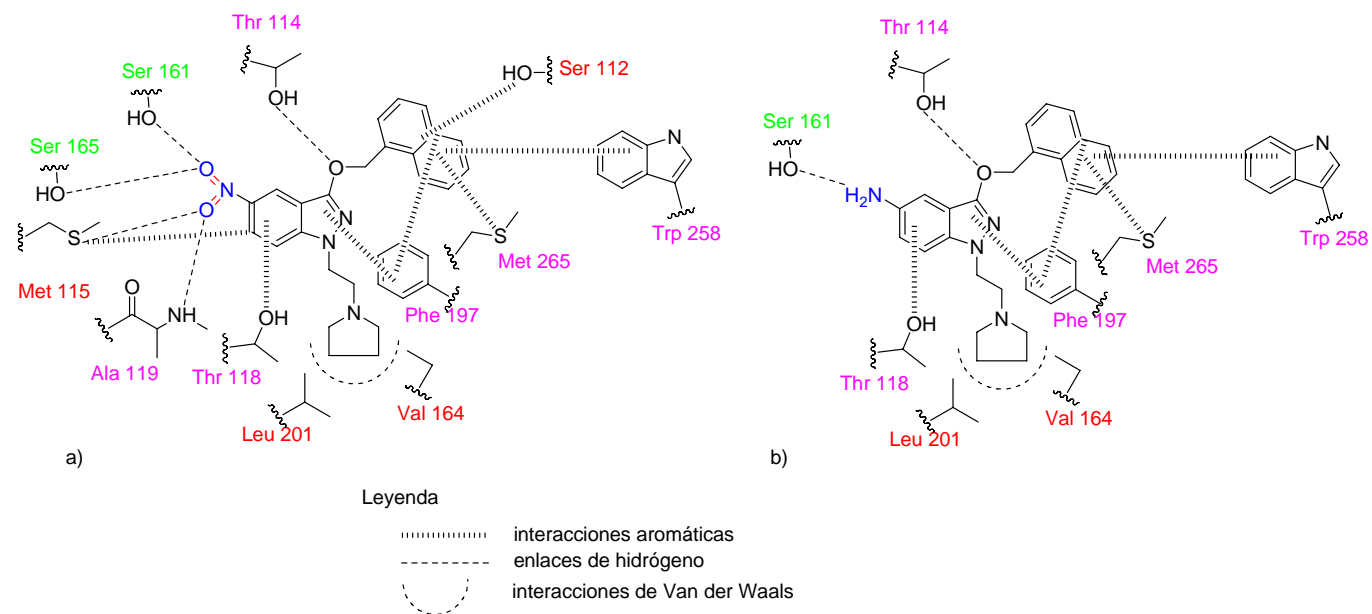


Figura 42. Ejemplo de las interacciones entre a) **26** y b) **36** y el centro activo de CB2. Solo se muestra las cadenas laterales de los aminoácidos excepto el residuo Ala119. Los residuos en color rojo y color verde son residuos involucrados en estudios mutacionales¹⁷¹.

7.2. ESTUDIOS DE LOS COMPLEJOS BuChE Y/O AChE-ÉTERES DE INDAZOL.

Dado el interesante efecto inhibitor sobre la BuChE ejercido por los derivados de indazol sintetizados que se comportan como agonistas cannabinoides, se ha realizado un estudio mediante modelización molecular de los correspondientes complejos con las enzimas BuChE y AChE, a fin de racionalizar los datos experimentales obtenidos. Para ello, se eligieron los inhibidores más representativos de cada enzima y, en este caso, dada la disponibilidad de la estructura cristalina de las enzimas involucradas, se utilizaron las estructuras 1B41¹³¹ de la AChE y 1P0I¹³² de la BuChE existentes en el *Protein Data Bank*. El estudio de simulación de la formación de los complejos ligando-enzima se efectuó mediante el programa FlexiDock. Para cada inhibidor, fue utilizada la conformación de menor energía de interacción para su posterior análisis. La energía de enlace y las interacciones entre cada inhibidor y la enzima se calcularon utilizando el programa Structural Thermodynamics Calculations (STC)¹⁸¹ y el programa Ligand Proteins Calculations (LPC)²²⁰, respectivamente. (vease la parte experimental, sección 10.3 para más detalles).

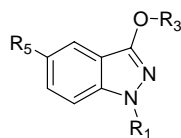
En el capítulo 3, ya se describió el sitio activo de ambas enzimas, que se subdivide en varios subsitos: una tríada catalítica (CAS, Ser-His-Glu), situada en la base de la garganta, un subsito aniónico (AS), un bolsillo de unión acilo (ABP) y subsito aniónico periférico (PAS), situado en la desembocadura de la garganta. Las diferencias más importantes entre la AChE y la BuChE, respecto a los aminoácidos involucrados, se encuentran en el PAS y en el ABP, donde la AChE tiene residuos más voluminosos, existiendo restricciones tanto en el tamaño del ligando como en cuanto a su colocación. En la parte experimental (sección 10.3), se muestran los residuos y las interacciones clave encontradas para la formación del complejo ligando - enzima tanto para la BuChE como para AChE utilizando como ligandos 3 inhibidores característicos de cada tipo de inhibición existente, el propidio (inhibición competitiva) el donepezilo (inhibición mixta) y el edrofonio (inhibición no competitiva).

Complejos éteres de indazol - BuChE

Utilizando la misma metodología que en el capítulo 3, se realizaron los estudios de los complejos formados con la enzima butirilcolinesterasa (BuChE, código pdb 1P0I¹³²) y los ligandos **4**, **10**, **26**, **30**, **31**, **32**, **34** y **36**. En la tabla 14, se puede distinguir la existencia clara de dos grupos de inhibidores en cuanto a la disposición del grupo en R₃. Así, un grupo lo forman los 1-naftilmetilderivados **26**, **30**, **31** y **36**, todos ellos inhibidores competitivos y el segundo grupo lo forman los 2-naftilderivados **4**, **10** y **34**, y el 4-metoxibencilderivado **32**, que muestran una cinética no competitiva, ya sea pura o mixta.

Para realizar una exposición más clara del estudio de las interacciones existentes, se va a estudiar en profundidad únicamente los compuestos más interesantes. Así, por una parte se han elegido los derivados **4** y **32**, que presentan una cinética de inhibición no competitiva, y el compuesto **34**, que se comporta como un inhibidor mixto. Además, se ha elegido el derivado **31** como ejemplo de inhibidor competitivo. En la tabla 17, se recogen las interacciones más importantes de estos cuatro derivados con la enzima BuChE.

Las mejores soluciones obtenidas en los estudios de anclaje de estos compuestos, muestran claramente que estos derivados se localizan a lo largo del túnel existente entre los sitios PAS y CAS de la BuChE (Fig. 43a). Visualmente, se observa que los derivados de indazolol estudiados, orientan el grupo aminoalquilindol de la posición en el N1 de dicho anillo hacia el interior de la garganta, de forma que dicho grupo se sitúa en las proximidades del Trp82.

Tabla 17. Interacciones clave entre la enzima BuChE y los compuestos **4**, **31**, **32** y **34**.

	4	31	32	34
<i>Tipo de inhibición</i>	<i>No Competitivo</i>	<i>Competitivo</i>	<i>No Competitivo</i>	<i>Mixto</i>
Asn68	VdW- R ₃	VdW- R ₃	VdW- R ₃	VdW- R ₃
Asp70		OD1- π _{indazol}		
Trp82		π -N _{R1} VdW-R ₁		VdW-R ₁
Gly116	VdW-R ₁	VdW-R ₁	VdW-R ₁	-
Gln119	-	CO-NH- π _{R3}	-	VdW-indazol
Thr120	-	-	-	EH (OD ₁ -N ₂)
Glu197	VdW-R ₁	-	VdW-R ₁	VdW-R ₁
Ser198	-	VdW-R ₁	-	VdW-R ₁
Ala277	-	VdW- R ₃	-	VdW- R ₃
Ala328	-	VdW-indazol	-	VdW-indazol
Phe329	-	π - π _{indazol}	-	π - π _{indazol}
Tyr332	π - π _{indazol}	OH _{Tyr} - π _{indazol}	π - π _{indazol}	π - π _{indazol}
His438	-	VdW-R ₁	-	VdW-R ₁

VdW: Van der Waals; EH: Enlace de hidrógeno

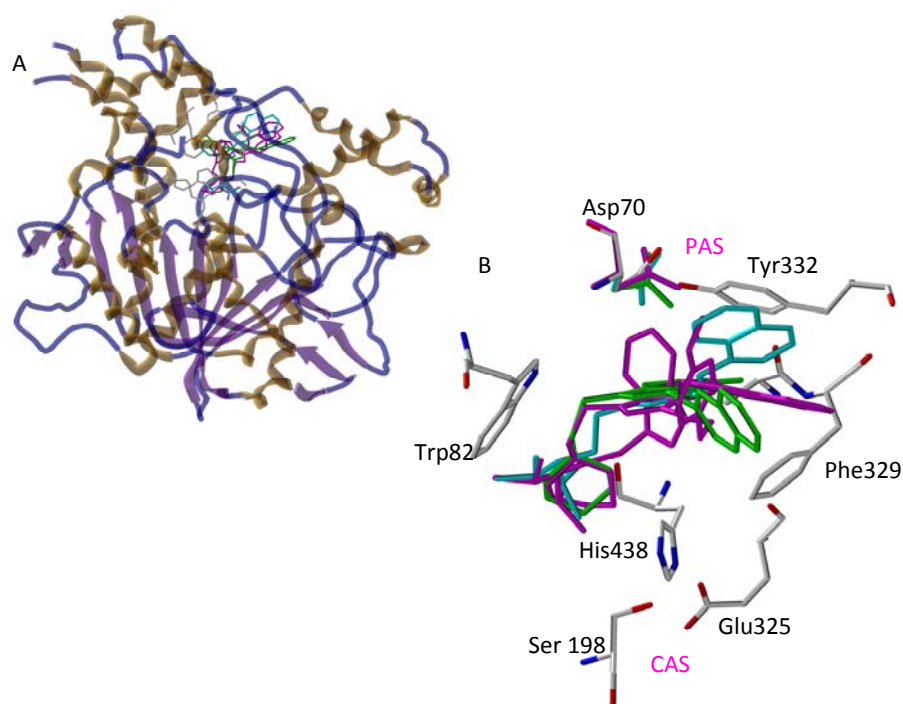


Figura 43. a) Representación esquemática de los complejos de la enzima BuChE con los derivados **31** (ciano), **34** (verde), **4** y **32** (magenta). b) Ampliación del centro activo de la enzima BuChE. Se muestra un ejemplo de cada tipo de inhibición: **31** (competitivo, ciano), **34** (mixto, verde), **4** y **32** (no competitivos, magenta). Los residuos de los diferentes subsitios, implicados en la interacción con los ligandos se muestran coloreados por tipo de átomos.

La figura 44 muestra la disposición e interacciones del compuesto **31**, ejemplo de un inhibidor competitivo, en el centro activo de la BuChE. El derivado **31** se posiciona en una conformación tal, que le permite interaccionar con el residuo Asp70 mediante una interacción π -aniónica entre los oxígenos carbonílicos del aminoácido y el sustituyente 1-naftilmetilo del derivado de indazolol. Este residuo, Asp70, es clave en la modulación del tipo de inhibición²²¹, ya que gracias a esta interacción el inhibidor se orienta adecuadamente para interaccionar con el residuo Trp82 mediante una interacción de tipo π -catión con el nitrógeno protonado del grupo en posición N1. Otro residuo importante en la formación del complejo es la Tyr332, que establece dos tipos de interacciones. Como se ve en la figura 44, existe, por un lado, una interacción π - π aromática con el

sustituyente 1-naftil del derivado **31** y, por otro, una interacción π -OH con su anillo de indazol.

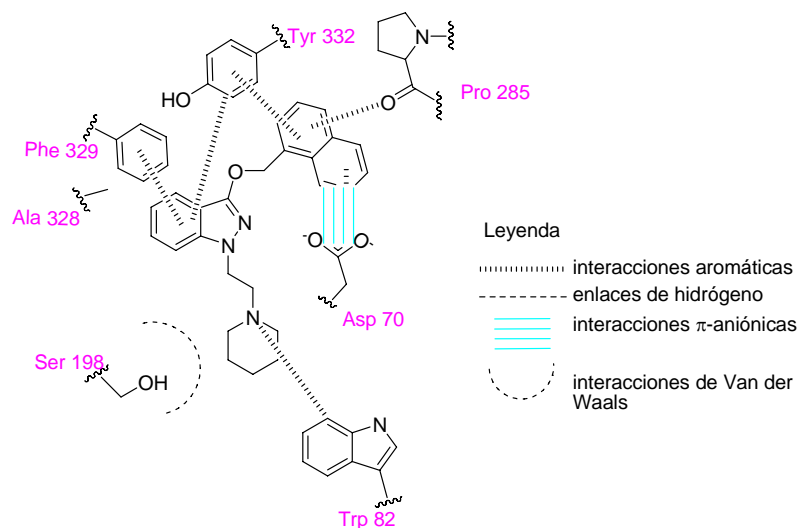


Figura 44. Representación esquemática de las interacciones más importantes entre el compuesto **31** y la enzima BuChE.

Estas interacciones anclan al compuesto en la orientación correcta para que los inhibidores competitivos, como el derivado **31**, puedan interaccionar, a través de la amina terciaria del sustituyente en la posición N1, con el residuo del sitio aniónico Trp82 mediante una interacción tipo π -catión y con el residuo Phe329 mediante una interacción π - π *stacking* con el anillo de indazol, de tal forma que se bloquea la entrada del sustrato natural, comportándose por tanto, como un inhibidor competitivo.

La interacción del sustituyente aminoalquilo de la posición N1 del indazol con el Trp82, resalta la importancia de éste agrupamiento para ejercer su capacidad inhibidora, ya que el rol de este residuo es la orientación y estabilización del amino cuaternario, lo que posibilita la interacción con la tríada catalítica. La importancia de este grupo queda demostrada por la ausencia de actividad inhibidora de los compuestos que carecen de él (capítulo 6, Fig. 34).

Como ya se comentó antes, otras diferencias importantes entre estos derivados residen en la disposición del sustituyente en la posición R₃. Experimentalmente se encuentra que los 1-naftilmetilderivados son inhibidores competitivos mientras que los compuestos sustituidos con un grupo 2-naftilmetilo en el oxígeno de la posición 3 se comportan como inhibidores no competitivos o mixtos (tabla 12).

La diferencia en el tipo de inhibición ejercida por estos compuestos, puede ser debida a la distinta disposición de los grupos 2-naftilmetilo y 4-metoxibencilo que, para evitar el impedimento estérico causado por los residuos de Thr284 y Pro285, se colocan de forma distinta al grupo 1-naftilmetilo (Fig. 45). Gracias a ese movimiento del anillo, por una parte, aparecen 2 nuevas interacciones: un enlace de hidrógeno entre el nitrógeno del indazol y el residuo de Thr120 y una interacción de tipo π -CO con la Ser287, entre el grupo carbonilo del aminoácido y el grupo 2-naftilmetilo, y por otra parte, desaparece la interacción con el residuo Asp70 del PAS, tanto en el derivado **34** (Fig. 46), como en los derivados **4** y **32**, lo que explicaría los tipos de inhibición mixta, en el caso del primero, y no competitiva en los otros dos.

Esta interacción, como se ha comentado anteriormente, es la responsable de fijar la orientación necesaria del ligando para bloquear la entrada del sustrato natural y, su ausencia, provoca una mayor movilidad del ligando en la enzima, permitiendo con ello la entrada del sustrato natural, dando lugar a una inhibición de tipo no competitiva-mixta.

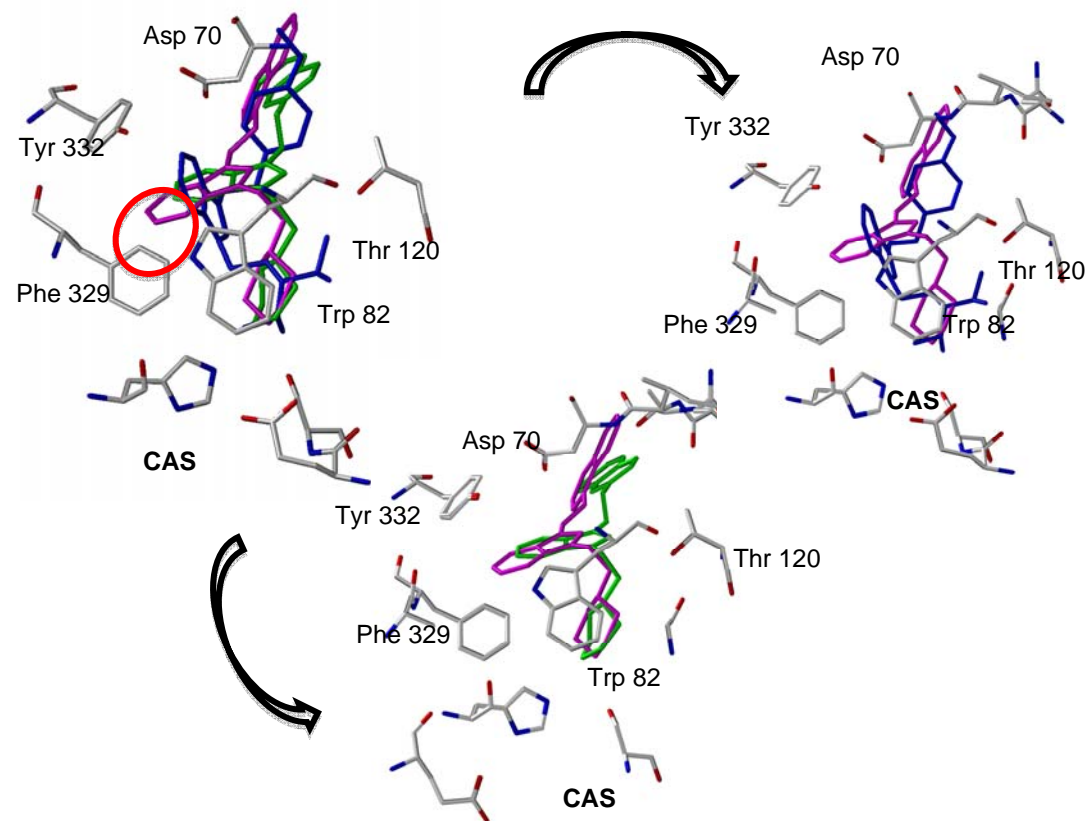


Figura 45. Superposición estructural de los derivados **4** (verde), **31** (magenta) y **32** (azul) en la enzima BuChE. Las interacciones claves están identificadas con un círculo rojo.

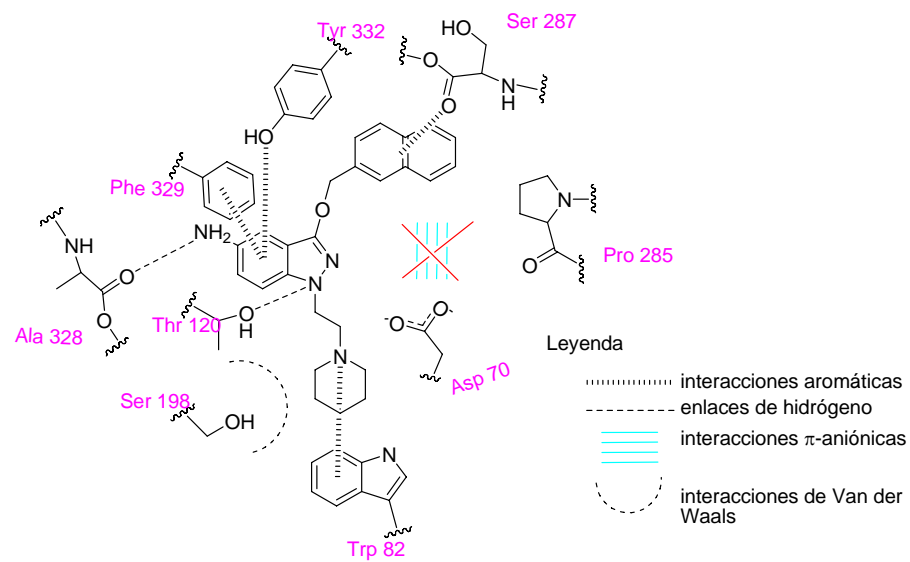


Figura 46. Representación esquemática de las interacciones de **34** en su sitio de unión con la enzima butirilcolinesterasa (BuChE).

Complejos éteres de indazol - AChE

Análogamente, se procedió a analizar el modo de unión de los derivados de indazol para lo cual se estudiaron los derivados **5**, **31** y **29**. El primero de ellos, **5**, corresponde con el derivado con mayor actividad de los compuestos obtenidos, selectivo de acetilcolinesterasa (AChE), mientras que los derivados **31** y **29** son ambos inhibidores competitivos de la enzima butirilcolinesterasa (BuChE) e inhibidores de AChE (10 μ M) de tipo mixto y competitivo, respectivamente. Las interacciones más importantes entre la AChE y los compuestos **5**, **31** y **29** se recogen en la tabla 18.

Tabla 18. Interacciones clave entre la enzima AChE y los compuestos **5**, **29** y **31**.

	5	29	31
<i>Tipo de inhibición</i>	<i>No Competitivo</i>	<i>Competitivo</i>	<i>Mixto</i>
Asp74	EH OD _{1ASP} -OR ₃	-	-
EH Asp74-Tyr341	-	EH _{Asp74-Tyr341-πnaftilo}	-
Trp86	VdW-R ₃	π - π naftilo	π - π naftilo
Tyr124	EH OH _{TYR} -OR ₃	EH OH _{TYR} -OR ₃	EH OH _{TYR} -OR ₃
Trp286	π - π indazol	π - π -R ₃	π - π naftilo
Phe295	π - π indazol	-	-
Phe297	π - π indazol	-	-
Tyr337	-	π - π ndazol	-
Tyr341	π - π ndazol	π - π naftilo π - π ndazol	π - π indazol

^aInteracción tipo π entre el enlace de hidrógeno formado entre los dos aminoácidos (Asp74 y Tyr341) y el grupo 1-naftilmetilo del compuesto **29**.

Conviene recordar que, la garganta que une los sitios PAS y CAS de las enzimas BuChE y AChE, presenta distintas dimensiones en cada una de ellas, siendo mayor en el caso de la BuChE, ya que en su estructura carece de residuos aromáticos del subsitio

aniónico y del bolsillo de unión acilo que si existen en la AChE. Así, los residuos Tyr214, Trp286, Phe295, Tyr337 y Phe297, están reemplazados por Gln119, Ala277, Ala328, Leu286 y Val288 en el caso de la BuChE (Fig. 47). De esta forma, la BuChE puede acomodar los derivados de indazol dentro del sitio de unión, permitiendo las interacciones de sus grupos amino con el Trp82, mientras que en el caso de la AChE no hay espacio para ello.

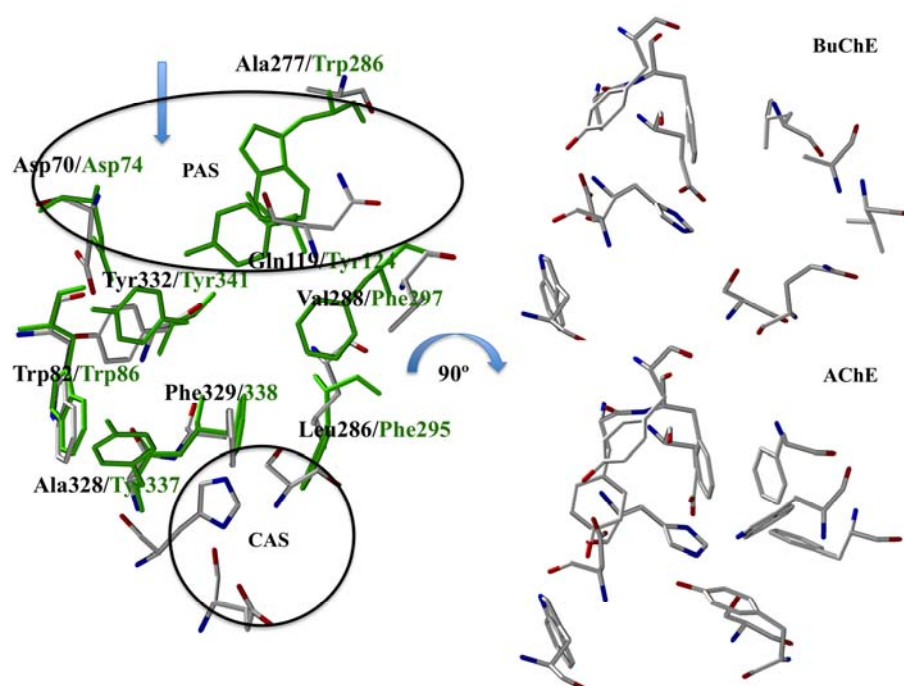


Figura 47. Superposición estructural de los sitios de unión de las enzimas AChE (residuos en verde) y BuChE (residuos en gris).

Esta diferencia de dimensiones de la garganta, puede jugar un papel importante en la selectividad BuChE/AChE, como se pone de manifiesto en los resultados obtenidos con los derivados **5**, **29** y **31**. Los resultados de los estudios de anclaje en la AChE (Fig. 48 y 49), muestran que los derivados más voluminosos, como **29** y **31** adoptan una conformación que difiere en 180° de la que adoptan en el complejo con la BuChE, es decir, se posicionan de tal forma que, el grupo amino está apuntando hacia fuera del

túnel, ya que la otra conformación hacia el interior de la garganta no es posible, debido al impedimento estérico ocasionado por los residuos aromáticos.

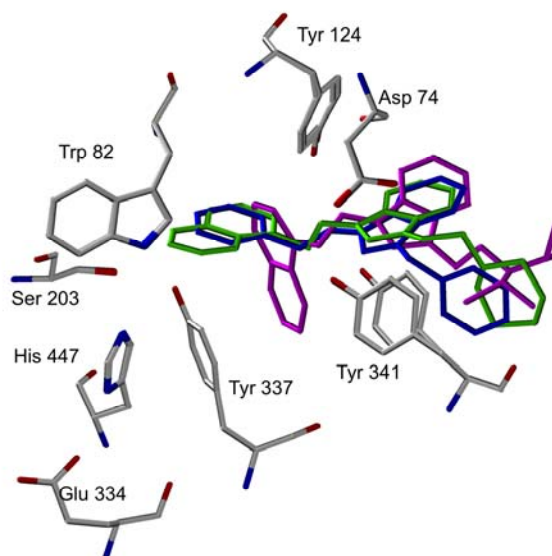


Figura 48. Representación esquemática de los compuestos **5** (azul), **29** (magenta) y **31** (verde) dentro del sitio activo de la AChE. Los residuos implicados en la unión con estos derivados se muestran coloreados por tipo de átomos.

Sin embargo el derivado **5**, que presenta en la posición R_3 un grupo menos voluminoso (bencilo) en lugar del grupo naftilmetilo y en R_1 un grupo aromático en lugar de un grupo aminoalquilo no presenta actividad inhibitoria alguna sobre la enzima BuChE, pero sí sobre la AChE. Esto se debe, principalmente a la interacción de tipo π - π *stacking* de estos grupos con los residuos aromáticos del bolsillo de unión acilo de la AChE, comportándose como un inhibidor no competitivo (Fig. 49) mientras que, en la BuChE, estas interacciones clave para anclar el derivado **5**, no tienen lugar.

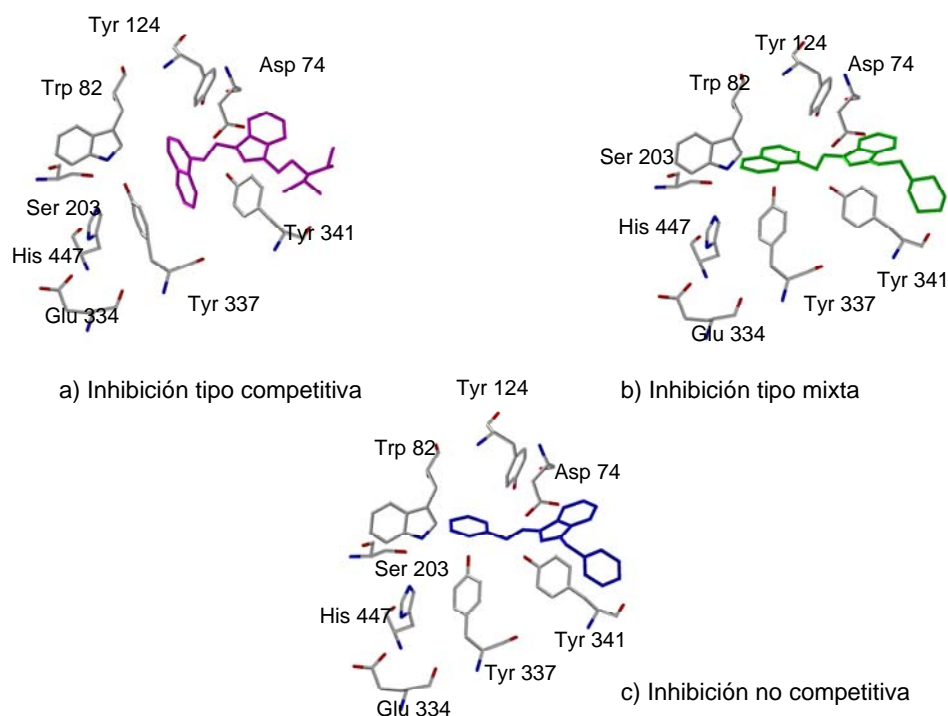


Figura 49. Representación esquemática de la disposición en el centro activo de la AChE de los derivados **5** (azul), **29** (magenta) y **31** (verde).

7.3.- CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios de anclaje de los cannabinoides más relevantes con el receptor CB2 han permitido refinar dicho receptor y proponer un modelo más elaborado del mismo. Los resultados obtenidos correspondientes a los éteres de indazol han puesto de manifiesto que la unión está dirigida principalmente mediante interacciones aromáticas con residuos claves del receptor CB2, tanto del esqueleto de indazol como del grupo aromático unido al oxígeno de la posición 3, siendo bastante concluyente la naturaleza de este grupo.

Los resultados de los estudios de anclaje de los cannabinoides más interesantes en las enzimas colinesterasas, han permitido conocer con mayor detalle, por un lado, el modo de unión de estos compuestos, y por otro, el mecanismo de inhibición sobre el sistema colinérgico.

Acerca de las interacciones de los éteres de indazol con la enzima BuChE, los resultados teóricos obtenidos indican que, por un lado, los éteres de 1-naftilindazol **30**, **31** y **36**, se colocan en el centro activo de tal forma que interaccionan con el residuo Trp82 del CAS, dando lugar a una inhibición competitiva, mientras que los 2-naftilderivados **4** y **34** y el compuesto **32**, se disponen de distinta manera, uniéndose a la BuChE en el centro periférico PAS, en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en los estudios cinéticos.

Asimismo, se ha demostrado la importancia, de por un lado, la existencia del grupo dialquilamino en la posición 1 para la acción inhibitoria de estos compuestos sobre la BuChE, así como la presencia de un grupo aromático en la función éter de la posición 3.

8. CRISTALIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB2 PARA SU RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X

8.1. INTRODUCCIÓN.

8.2. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

8.3. RESULTADOS.

8.1. INTRODUCCIÓN.

La cristalografía de rayos X es una técnica experimental que se utiliza para la determinación de estructuras moleculares a resolución atómica. La resolución de la estructura tridimensional de proteínas mediante difracción de rayos X requiere de la obtención de monocristales de suficiente calidad para poder medir su espectro de difracción²²².

Entendemos por cristal, una red imaginaria formada por unidades elementales idénticas denominadas cada una de ellas *celdilla unidad* (Fig. 50). Dichas unidades elementales van a repetirse, por traslación, a lo largo de las tres direcciones del espacio generando así el volumen total del cristal. A su vez, esta celdilla unidad está formada por una unidad mínima denominada *unidad asimétrica*, tal que el contenido de la celdilla unidad es el resultado de aplicar las operaciones de los elementos de simetría sobre la unidad asimétrica.

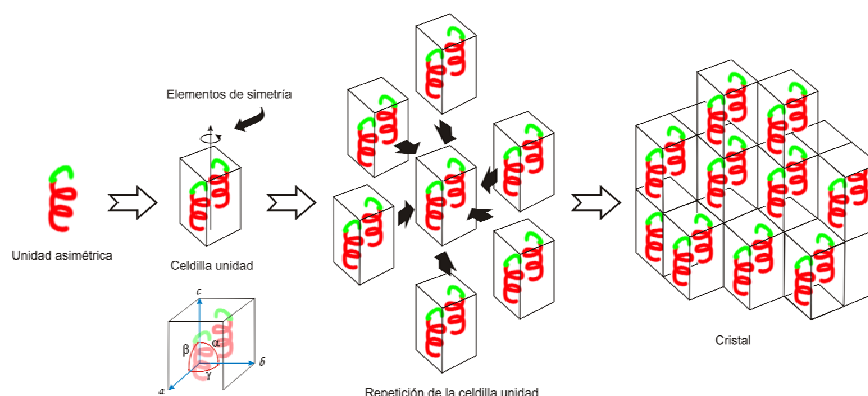


Figura 50. Conceptos básicos de cristalografía.

La celdilla unidad está definida por tres ejes (a , b , c) y tres ángulos interaxiales (α , β , γ). La combinación de la celdilla unidad y de los elementos de simetría determina el grupo espacial, el cual describe el patrón de repetición por el que la unidad asimétrica es capaz de reproducir el empaquetamiento cristalino. Existen

230 grupos espaciales, de los cuales, debido a su quiralidad, solamente 65 de ellos son posibles para los cristales de proteína, y se encuentran recogidos en las *Tablas Internacionales* (International Tables for X-ray Crystallography).

Principios de cristalización.

La cristalización de proteínas consiste en un cambio de fase desde la macromolécula en solución acuosa a un sólido cristalino. Para lograr este cambio de fase, se deben encontrar aquellas condiciones de solubilidad de nuestra molécula en la que ambas fases, líquida y sólida, se encuentren en equilibrio. Esta búsqueda supone encontrar las condiciones en la que la solución de la proteína alcance un estado de sobresaturación y se desplace lentamente al estado de precipitación. Al desplazarse hacia la zona de precipitación, el exceso de proteína disuelta tiende a la agregación, formando pequeños núcleos que servirán de germen para el crecimiento de los cristales (Fig. 51).

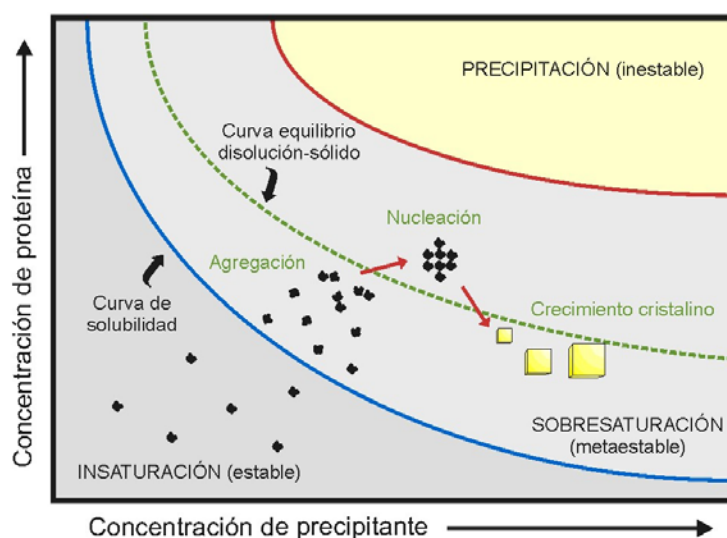


Figura 51. Diagrama de solubilidad de una proteína.

Este proceso de cristalización se puede dividir en dos etapas, una primera etapa de nucleación y una segunda etapa de crecimiento cristalino. En la primera etapa, el factor más importante a tener en cuenta es la velocidad a la que se llega al punto de saturación, siendo conveniente que ésta no sea muy elevada, ya que ello conduce a la formación de un número bajo de núcleos de cristalización, lo cual permita el crecimiento a unos pocos cristales de buen tamaño. Si superamos el punto de saturación con rapidez, favorecemos la formación de un elevado número de núcleos que generan numerosos y pequeños cristales o incluso, si la velocidad es excesiva, podemos producir la precipitación y/o desnaturalización de la proteína.

En la segunda etapa de crecimiento, la solución de proteína tiende a volver al estado estable de saturación, por lo que el exceso de moléculas en solución tiende a incorporarse de manera ordenada sobre los núcleos de cristalización, dando lugar al crecimiento de los cristales.

Las proteínas son moléculas que se caracterizan por su elevado tamaño y la presencia de una esfera de solvatación. Estas propiedades hacen que las proteínas formen celdillas generalmente grandes y den lugar a empaquetamientos cristalinos con grandes canales ocupados por moléculas desordenadas de disolvente. El elevado tamaño de la celdilla, junto con la baja densidad de moléculas de proteína dentro del cristal, hace que el espectro de difracción de estos cristales sea débil. Además del elevado porcentaje de disolvente que presentan estos cristales, las interacciones que se establecen entre las distintas moléculas para formar el cristal son débiles y, generalmente, escasas, lo que confiere a los cristales de la proteína una gran fragilidad que en ocasiones dificulta su manipulación.

Por tanto, el primer objetivo en la resolución de la estructura de una proteína por difracción de rayos X es la obtención de un monocristal que tenga el mayor tamaño posible (mayor número de elementos dispersores) y la menor

mosaicidad. Este parámetro informa del orden interno que posee un cristal, considerándolo como la adición de micro-dominios apilados en las tres direcciones del espacio. Cuanto más imperfecto y desordenado sea este apilamiento, mayor será la mosaicidad y peor la calidad cristalina, lo que generará peores datos de difracción.

Ensayos de cristalización. Búsqueda de condiciones óptimas.

Al abordar la cristalización de una proteína nueva, se carece por completo de información acerca de las condiciones que van a llevar a dicha proteína al estado de sobresaturación antes mencionado. Así, la estrategia inicial a seguir consiste en probar sistemáticamente una amplia gama de condiciones en las que se varían todos los parámetros posibles. Para ello, se dispone de una batería con distintas condiciones comerciales establecidas a partir del análisis estadístico de las condiciones de cristalización de cientos de proteínas²²³, sobre las que se hacen los ensayos iniciales, utilizándose muy pequeños volúmenes de solución protéica, con el fin de gastar la mínima cantidad posible de la misma. Las condiciones del ensayo de precipitación varían en función sobre todo de tres parámetros principalmente:

Agente precipitante. Generalmente son polímeros de diferente masa molecular, como el polietilenglicol (PEG) y sales. Con menor frecuencia, también se utilizan compuestos orgánicos como alcoholes. Además de la naturaleza del precipitante, también se varía la concentración del mismo.

pH. Normalmente se trabaja en un rango de pH de entre 4,0 a 8,5, variando también la naturaleza del tampón utilizado.

Solución de proteína. En cuanto a la muestra de proteína, la concentración de partida que suele utilizarse es del orden de 10 mg / mL. Esta concentración puede variar en función de la solubilidad, la estabilidad o la obtención de la muestra.

Una vez encontradas unas posibles condiciones adecuadas para la cristalización de la proteína a estudiar, se procede a su optimización, variando ligeramente los parámetros correspondientes a esa condición en particular, a fin de obtener el monocristal deseado.

También se suelen introducir aditivos conocidos que facilitan una óptima cristalización de la proteína. Los aditivos utilizados pueden ser sales, alcoholes, detergentes y otras moléculas de pequeño tamaño a baja concentración.

Recogida de datos de difracción de Rayos X.

Una vez obtenido el cristal, se procede a la medida de su espectro de difracción. El montaje experimental consiste en “capturar” los cristales con un lazo de nylon (Fig. 52), vitrificándolo a 100 K con aire enfriado con N₂ líquido, para después hacer incidir sobre él un haz monocromático de rayos X.

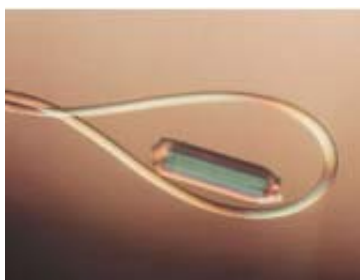


Figura 52. Proceso de captura del cristal con lazo.

Los rayos X dispersados por los electrones de las moléculas ordenadas en el cristal, generan máximos de difracción (dispersión cooperativa). Estos picos de difracción, también llamados reflexiones, siguen la ley de Bragg (Fig. 53), que relaciona el espacio entre planos atómicos (d) con el ángulo de incidencia / dispersión de los rayos X (θ) y la longitud de onda de la radiación (λ). De acuerdo con la Ley de Bragg, la mayor resolución de difracción (la distancia d es

muy pequeña) se obtendrá a ángulos de dispersión θ altos, ya que la longitud de onda de la radiación λ permanece constante durante el experimento. La intensidad de la difracción decae al aumentar el ángulo de incidencia debido a la mayor interferencia destructiva entre los electrones de los átomos y a la calidad del cristal, lo que afecta a los datos de mayor resolución.

La dispersión de los rayos X generará un espectro de difracción que se medirá y digitalizará en un detector y, posteriormente, se transformará en valores de intensidades asociados a cada familia de planos de Bragg. El conjunto de los máximos de difracción constituye el “espacio recíproco”.

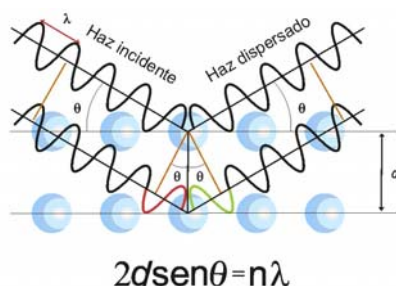


Figura 53. Ley de Bragg.

Convencionalmente, los rayos X se generan en tubos de alto vacío al emitir electrones un cátodo, los cuales son acelerados dentro de un campo eléctrico, bombardeando el ánodo y produciendo así la radiación. Sin embargo, en el caso particular de los cristales de proteína, y debido a sus especiales características, es necesario utilizar frecuentemente fuentes de rayos X mucho más intensas, que permitan obtener patrones de difracción adecuados.

Para el estudio del receptor CB2 y debido a la complejidad de su estructura, se ha elegido la radiación sincrotrón, ya que es la fuente de rayos X más intensa que existe. El sincrotrón consta de un anillo de cientos de metros de longitud por el que se hacen circular electrones a velocidades cercanas a la de la luz (Fig. 54). Al quebrarse la trayectoria de los electrones mediante imanes, para así conseguir

la curvatura del anillo, se produce la emisión de una radiación muy energética y tangencial a la dirección seguida por los electrones, denominada radiación sincrotrón. La radiación emitida muestra un espectro continuo muy amplio de longitud de onda, en el que se encuentran incluidos los rayos X. Por tanto, la radiación sincrotrón tiene como ventajas fundamentales su mayor brillo y la posibilidad de seleccionar la longitud de onda que se desee.



Figura 54. Esquema de una fuente de radiación sincrotrón.

Procesado de datos experimentales de difracción de rayos X.

En caso de obtener unos buenos datos experimentales de difracción de rayos X, el siguiente paso para obtener la estructura de la proteína es el procesamiento de los datos obtenidos. A partir del espectro de difracción, se puede obtener información tanto de la topología del cristal como de las dimensiones de la celdilla elemental. Por otro lado, la distribución de intensidades permite obtener los elementos de simetría del grupo espacial. Para el procesamiento de los datos de difracción se siguen los siguientes pasos:

Caracterización del cristal. Se obtiene información sobre la geometría de la celdilla unidad. Este proceso se denomina “indexado” y en él se asignan a cada máximo de difracción unos índices hkl (Índices de Miller) que representan la difracción por un conjunto de planos de átomos del cristal.

Estimación de las intensidades de los máximos de difracción. Este proceso tiene dos fases: la estimación de la intensidad de cada reflexión,

obtenida mediante la integración de las intensidades asociadas a cada elemento del área de cada reflexión, y el escalado de las intensidades, para el que se utilizan una serie de parámetros estadísticos.

Obtención del módulo del factor de estructura $F(hkl)$. El factor de estructura es la resultante de las ondas dispersadas por todos los átomos de la celdilla unidad en cada dirección y se obtiene a partir de la medida de las intensidades corregidas y escaladas de cada haz difractado con índices hkl , siendo la intensidad proporcional al cuadrado del módulo del factor de estructura.

Mediante la asignación a cada máximo de los índices hkl y el cálculo del módulo de su factor de estructura se llega al resultado final del experimento de difracción. Para ello se emplean diferentes programas como MOSFLM, SCALA, TRUNCATE, todos ellos incluidos en el paquete informático CCP4²²⁴.

Resolución de la estructura de la proteína.

Para determinar la estructura tridimensional de una proteína se necesita obtener el mapa de densidad electrónica $\rho(xyz)$ definido en cada punto de la celdilla unidad, ya que sus máximos determinan las posiciones de los átomos y, por tanto, la estructura tridimensional de la proteína.

Una vez obtenidos los módulos del factor de estructura de cada reflexión, para obtener el mapa de densidad electrónica $\rho(xyz)$, se necesita tanto los módulos $|F(hkl)|$ de cada reflexión obtenidos previamente a partir de los datos de difracción como sus fases α . En el experimento de difracción se pierden éstas últimas, por lo que hay que recurrir a distintos métodos para solucionar este problema:

Método de Patterson²²⁵. Es la transformada de Fourier de las intensidades, y proporciona información acerca de la orientación relativa y la longitud de cada vector interatómico de la estructura, tanto a nivel intramolecular como

intermolecular. En el caso de las proteínas, debido a la gran cantidad de vectores que se generan, no es suficiente para la resolución de la estructura, permitiendo, en combinación con otros métodos de resolución estructural de proteínas, la obtención de fases iniciales.

Reemplazamiento Molecular. Este método utiliza como fases iniciales las de una proteína de estructura conocida que se toma como modelo. Necesita una similitud entre las proteínas superior al 30%.

Reemplazamiento Múltiple Isomorfo. Consiste en la introducción de átomos pesados (Au, Hg, Pd, etc.) en zonas del cristal ocupadas por el solvente. Mediante la comparación de los espectros de difracción de la proteína nativa y del derivado con el átomo pesado, se pueden determinar las posiciones de los átomos pesados en el cristal (utilizando los mapas de Patterson), siempre y cuando ambos cristales sean isomorfos.

Dispersión Anómala Múltiple. Cuando la longitud de onda de los rayos X está muy próxima al máximo de absorción de un elemento, la radiación absorbida produce un desplazamiento en la fase y la amplitud de la radiación dispersada. Esto genera una desigualdad en las reflexiones relacionadas por simetría (parejas de Friedel) que deberían ser iguales en amplitud y presentar fases opuestas. Sólo los átomos pesados contribuyen de forma significativa a la dispersión anómala, por lo que es necesario que en el cristal exista alguno. Además, es necesario recoger datos a tres longitudes de onda distintas correspondientes al máximo de absorción, al punto de inflexión de la curva de absorción y a una longitud de onda en la cuál la dispersión anómala sea mínima.

Dispersión Anómala Simple. Este método está basado en la capacidad dispersora anómala de átomos pesados con una señal anómala muy intensa a la longitud de onda de medida, lo que permite resolver el problema de la fase con datos recogidos a una única longitud de onda.

8.2. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

Introducción y antecedentes.

Como ya se ha descrito anteriormente, el receptor cannabinoide CB2 es un receptor perteneciente a la superfamilia de receptores transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs). Fue clonado por vez primera en 1992²⁵ y está compuesto por 360 aminoácidos con un peso molecular de 39680 KDa. Su estructura consta de 7 hélices transmembrana unidas por bucles, siendo ésta una característica común a este tipo de receptores.

La cristalización de los GPCRs conlleva una gran dificultad debido a la presencia de esas 7 regiones transmembrana. Las especiales características e interacciones que existen entre estas regiones provocan que para obtener un cristal ordenado de la estructura sin desnaturalizar sea necesario emular de alguna manera las condiciones físico-químicas existentes en la membrana celular. Esta dificultad se pone de manifiesto en el número tan pequeño de estructuras de proteína de membrana depositadas en la base de datos *Protein Data Bank*, en relación a la cantidad de estructuras proteicas totales. De hecho, hasta ahora, sólo 43 estructuras de receptores acoplados a proteínas G, incluyendo subespecies o cocrystalizaciones con diferentes ligandos, han sido depositadas en el *Protein Data Bank* (parte experimental, sección 10.4, tabla 26), mientras que el número total de estructuras depositadas asciende a más de 77000, lo cuál da una idea de la extrema dificultad que conlleva la cristalización de este tipo de proteínas.

La cristalización de estos receptores se realizó en distintas condiciones especiales, que van desde la preparación de micelas mixtas, mediante la adición de algún agente anfipático, caso de la rhodopsina²²⁶, al empleo de muestreos de condiciones de cristalización basados en el método "*Pi sampling*"²²⁷, donde se utilizan surfactantes como colesterol y OTG (octil-tiogluósido), caso de los complejos agonista-receptor de adenosina A_{2A}²²⁸ pasando por el uso de la técnica

LCP²²⁹ (*"lipid cubic phase"*), que consiste en la creación de una bifase continua cúbica a lo largo de las tres dimensiones formada por lípidos agrupados en micelas en disposición de red cúbica, que emula las características de la membrana celular, caso de la cristalización del complejo doxepina-receptor de histamina H₁²³⁰.

Cristalización del recetor hCB2. Ensayos Iniciales.

Todos los estudios experimentales se han realizado con el receptor CB2 humano a una concentración aproximada de 8 mg / mL, en membranas suspendidas en una disolución 50 mM TRIS-HCl, 2,5 mM EGTA, 5mM MgCl₂ y 10 % sucrosa a un pH de 7,4.

Se realizó un chequeo inicial con distintos *screenings* comerciales (PACT, CLITE I y II, JCSG) utilizando 250 nL de disolución precipitante y 250 nL de la suspensión en la que está contenida la proteína. El método elegido para estos primeros ensayos fue el método de gota sentada, utilizando para ello un robot de cristalización (Nanodrop, Innovadyne) (Fig. 55a). El seguimiento de la evolución de las placas se realizó a través de fotografías tomadas periódicamente a cada condición de ensayo a través de una plataforma robotizada de visualización y toma de fotografías de placas (Crystal Farm, Fig. 55b).

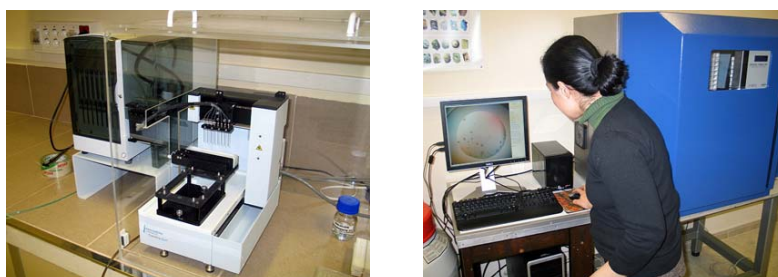
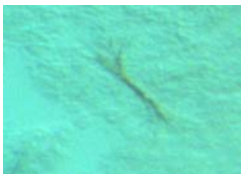
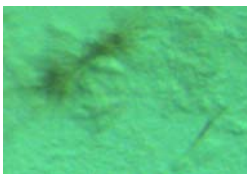

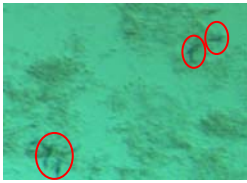
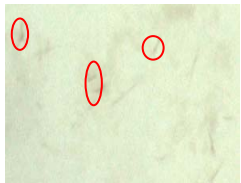



Figura 55. a) Robot de Cristalización. b) Crystal Farm

En varias de estas condiciones si bien se obtuvieron cristales en forma de aguja o con muchos pequeños núcleos de cristalización, fueron demasiado pequeños para poder obtener un espectro de difracción.

En la tabla 19 se recogen las fotos junto a las condiciones empleadas que condujeron a los mejores resultados. Como puede observarse, los cristales obtenidos en estos primeros muestreos, fueron pequeños, aunque en general con bastantes núcleos de precipitación, patrón característico de proteína.

Tabla 19. Condiciones iniciales de cristalización donde se obtuvieron algún tipo de cristales.

Condiciones	Foto	Condiciones	Foto
A 0,05 M Tris pH = 8,5 0,5 M Li_2SO_4 0,005 M NiCl_2		B 0,1 M HEPES pH = 7,5 20% v/v Jeffamine M-600	
C 0,1 M citrato diamónico 20% w/v PEG3350		D 0,05 M MES pH = 6,5 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5% v/v 1,4-dioxano	
E 0,1 M BICINE pH = 9,0 10% v/v MPD		F 0,2 M Li_2SO_4 0,05 M Tris pH = 8,5 40% v/v PEG400	







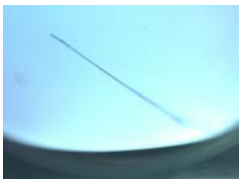

En las fotografías, se puede observar que la forma que adoptan los cristales obtenidos varía desde pequeños núcleos cristalinos (F), a agujas (C y E), o de forma estrellada (A, B, D). Si bien la calidad de los mismos no era buena, ya el hecho de que una proteína integral de membrana cristalizara en estos primeros ensayos, era una buena noticia, más si cabe teniendo en cuenta que la proteína se utilizó sin realizar ninguna purificación previa y utilizando para los ensayos condiciones comerciales estándar (ver antecedentes).

Optimización de las condiciones de cristalización.

Con el fin de mejorar el tamaño y la calidad de los cristales obtenidos, se prepararon nuevos muestreos (*screenings*) variando las condiciones en las que se habían obtenido los cristales anteriores (tabla 19). Así, variando el pH, la concentración de sal o el porcentaje de disolvente utilizado, se realizó un barrido completo alrededor de las condiciones de origen. En varios de estas nuevas condiciones se obtuvieron nuevamente cristales, aunque, salvo en el caso de la condición E (tabla 18), no se consiguió aumentar ni el tamaño ni la calidad de los mismos.

A partir de la condición E (tabla 19), donde se habían obtenido muchos pequeños cristales en forma de aguja, aparecieron nuevamente cristales en distintas condiciones, de las cuales se muestran los mejores en cuanto a tamaño y definición en la tabla 20. Como se observa en las fotografías, las agujas que aparecieron en las condiciones iniciales, vuelven a aparecer en estos ensayos, a partir de los 10 días, pero a unas concentraciones de MPD (2-metil-2,4-pentanodiol) mucho mayores, de entre 30 -40 % (en el ensayo inicial, la concentración de MPD era de 10%). El patrón de precipitación, sigue sugiriendo naturaleza proteínica, como se observa en la foto E₂, que es una imagen de toda la gota, y donde se observan varias agujas / barritas de precipitado.

Tabla 20. Condiciones y fotos de los mejores cristales obtenidos en el proceso de optimización de la condición E (ver tabla 17).

	Condiciones	Foto		Condiciones	Foto
E ₁	0,1 BICINE		E ₂	0,1 BICINE	
	pH = 9,0 30% v/v MPD			pH = 9,0 32% v/v MPD	
E ₃	0,1 BICINE		E ₄	0,1 BICINE	
	pH = 8,5 32% v/v MPD			pH = 8,5 32% v/v MPD	
E ₅	0,1 BICINE		E ₆	0,1 BICINE	
	pH = 8,5 32% v/v MPD			pH = 8,5 32% v/v MPD	
E ₇	0,1 BICINE		E ₈	0,1 BICINE	
	pH = 8,5 36% v/v MPD			pH = 8,0 40% v/v MPD	

Las condiciones E₃ - E₆ son detalles ampliados de la misma gota, tomadas en días distintos. Como se puede observar, los cristales de las condiciones E₅ y E₆, presentan una gran polarización cuando se observan al microscopio electrónico usando un cristal polarizador. Ello, unido a que su aparición fue bastante posterior a la de los cristales de las fotografías E₃ y E₄, nos hicieron sospechar que no pertenecían a la proteína, sino a algún tipo de sal, por lo que decidimos tomar el patrón de difracción de alguno de ellos en el difractómetro del propio Instituto

Rocasolano, cuya potencia es mucho menor que la radiación sincrotrón, pero que, aún con estos cristales tan pequeños, permitiría discriminar el espectro de difracción de una sal. Efectivamente, estos cristales ofrecieron un claro patrón de difracción salino, con muy pocos *spots* que llegan a una gran resolución. Por ello, finalmente estos cristales no se eligieron para llevarlos al SLS (*Swiss Light Source*). Las fotos correspondientes a las condiciones E₇ y E₈, ofrecen unos cristales con un aspecto muy parecido a los de la condición E₂, aunque en estos casos, se ha formado un único cristal de mayor tamaño, en vez de la polinucleación de la condición E₂. En cambio, en la fotografía tomada de la condición E₁, se observa un cristal muy bien definido y con gran polarización, por lo que hay que esperar a la toma de datos de difracción de rayos X, para poder determinar si pertenece a la proteína o a algún tipo de sal existente en la muestra (MgCl₂).

En vista de la aparición de cristales que pudieran pertenecer a la estructura protéica, se ha iniciado también un proceso de cocrystalización, en las condiciones E₂, de la proteína junto con uno de nuestros ligandos agonistas CB2, proceso que está todavía en marcha.

8.3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Varios de los cristales obtenidos (condiciones E₃ y E₄, tabla 19), fueron llevados al sincrotrón *Swiss Light Source* (SLS) en Zürich (Suiza) para ser irradiados con una línea de radiación monofoco de alta potencia, con el fin de intentar obtener un patrón de difracción de rayos X a partir de ellos. Sin embargo, y desgraciadamente, no fue posible obtener ningún dato de la estructura proteica. En cambio, algunos patrones de difracción obtenidos corresponden a algún tipo de sal. Esto puede ser debido tanto a la mala calidad y pequeño tamaño de los cristales obtenidos, lo que explicaría la ausencia de un patrón de proteína, unido a la posibilidad de que en el proceso de captura, vitrificación y manipulación de la

muestra, se pueden haber formado sales alrededor del cristal, lo que explicaría los patrones de sal observados.

No obstante, existen motivos que nos inducen a pensar que los cristales obtenidos, o al menos parte de ellos, son cristales del receptor CB2. En primer lugar, en casi todos los casos, el patrón de precipitación es típico de las estructuras proteicas, con muchos núcleos de cristalización, mientras que los cristales de sal suelen ser pocos y de mayor tamaño. En segundo lugar, estos cristales no son fácilmente reproducibles, lo que apunta más al problema de la heterogeneidad de la muestra y la existencia en ella de membranas más que a una sal, que se encontraría a una concentración uniforme en la muestra y, por tanto, siempre cristalizaría en las mismas condiciones. En tercer lugar, casi todas las condiciones en las que se han obtenido cristales son condiciones básicas, con un valor de pH de entre 7 y 9. Éste pH está próximo al punto isoelectrico (pI) teórico de la proteína calculado con el programa Protparam (pI = 8,52). Ésto es lógico, ya que el punto isoelectrico de una proteína es aquel pH en el que con la contribución de todos sus aminoácidos, la proteína carece de carga, y por tanto su solubilidad es menor.

Dada la extraordinaria relevancia que tendría la cristalización de una proteína de membrana como hCB2, se va a continuar realizando experimentos sobre los cristales obtenidos, enviando nuevos cristales al sincrotrón *Swiss Light Source* (SLS) correspondientes a las condiciones E₄, E₇ y E₈ (ver tabla 20)

En el caso de que los cristales obtenidos fueran efectivamente de hCB2 y no fuera posible elucidar la estructura a partir de los datos de difracción obtenidos con los cristales enviados al SLS, el paso siguiente sería escalar estas condiciones, es decir, aumentar la cantidad y/o concentración de la proteína para intentar conseguir unos cristales con una calidad y tamaño adecuados para obtener el espectro de difracción completo de rayos X de la proteína a resolución atómica. Otra posibilidad a tener en cuenta, sería intentar cristalizar el receptor

hCB2 utilizando condiciones especiales, ya comentadas en la introducción de este apartado, más específicas de proteínas de membrana, como la formación de micelas mixtas o de bifases cúbicas lipídicas.

9.- CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo recogido en la presente Memoria, referida al diseño de fármacos multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en sus distintos aspectos tanto de diseño, sintéticos, como farmacológicos, se pueden resumir en los siguientes apartados:

1. **La utilización de técnicas de Docking** en la etapa de diseño ha permitido la identificación de nuevos cannabinoides derivados de indazol. Desde un **punto de vista metodológico**, se ha demostrado la utilidad de la quimioinformática en la identificación y caracterización de nuevos fármacos, ya que, con un número pequeños de compuestos sintetizados bien elegidos, se puede obtener la misma información que con series mucho más grandes. Esto disminuye considerablemente los recursos tanto materiales como de capital humano, con el consiguiente ahorro económico.

Los resultados de los estudios de anclaje tanto de los cannabinoides más relevantes como de los éteres de indazol, han permitido refinar el modelo 3D del receptor CB2 y establecer las interacciones que orientan la unión en el centro activo.

Los resultados de los estudios de anclaje de los cannabinoides más interesantes en las enzimas colinesterasas, han permitido conocer con mayor detalle el lugar de unión de estos compuestos y, por tanto, el mecanismo de inhibición sobre el sistema colinérgico.

2. **A nivel sintético**, se han desarrollado diferentes procedimientos para la obtención de derivados sustituidos en N-1 y O-3. Este trabajo ha permitido la preparación de un conjunto representativo de éteres de indazol desde un punto de vista estructural. Asimismo, el estudio de la reactividad del sistema de 5-nitroindazol, ha proporcionado procedimientos sintéticos, entre los que cabe destacar la reducción del grupo nitro para dar lugar a la formación de

los 5-aminoderivados, a partir de los cuales es posible abordar la preparación de compuestos no accesibles por síntesis directa.

3. **Desde el punto de vista farmacológico**, los estudios realizados han permitido identificar nuevos *hits multitarget* que presentan, simultáneamente, propiedades cannabinoides y colinérgicas. Se pueden distinguir diferentes tipos de comportamiento, lo que confiere a esta nueva familia de cannabinoides, una mayor relevancia e interés farmacológico. En este sentido se han caracterizado nuevos fármacos derivados de éteres de indazol con propiedades:

- *Full* agonistas cannabinoides inhibidores de la BuChE con inhibición de tipo mixto como el derivado **34**.
- *Full* agonistas cannabinoides inhibidores de la BuChE con inhibición de tipo no competitivo como los compuestos **4** y **32**.
- *Full* agonistas cannabinoides inhibidores de la BuChE con inhibición de tipo competitivo como los derivados **30**, **31** y **36**. Hay que resaltar que el compuesto **31** se comporta, además, como inhibidor de la AChE con una inhibición de tipo mixto.
- Agonistas cannabinoides inhibidores de la BuChE con efecto antioxidante como el derivado **32** y, sobre todo, el compuesto **36**.

De acuerdo con los objetivos planteados en esta memoria y como conclusión final, se puede afirmar que se han identificado y preparado nuevos éteres de indazol, que se comportan simultáneamente como agonistas cannabinoides e inhibidores de BuChE, como consecuencia de la interacción en ambas dianas (Fig. 56).

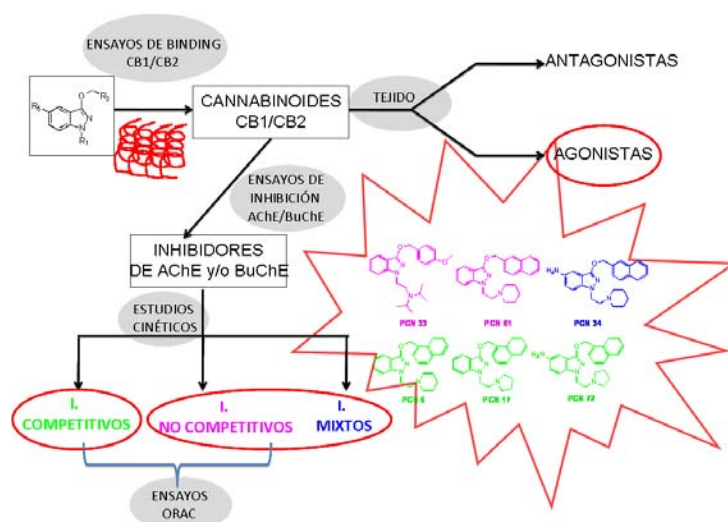


Figura 56. Esquema representativo del descubrimiento de nuevos éteres de indazol con propiedades de agonistas cannabinoides, con actividad inhibidora sobre enzimas colinesterasas y propiedades antioxidantes

La utilización de estos fármacos representa una nueva estrategia, descrita en nuestro grupo de investigación por primera vez, como tratamiento alternativo para la enfermedad de Alzheimer. Todos estos resultados se recogen en una patente PCT/ES2010/000400, siendo la primera patente descrita de derivados multidiana (cannabinoide, BuChE/AChE), como posible aproximación terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Además, el trabajo de investigación presentado en esta memoria, ha dado lugar a la redacción de dos artículos de investigación, uno de ellos en la revista *Current Alzheimer Research* (en prensa) y otro en preparación.

10.- PARTE EXPERIMENTAL

10.1. QUÍMICA.

a) Métodos generales.

b) Síntesis

10.2. FARMACOLOGÍA.

a) Actividad cannabinoide.

Ensayos de desplazamiento de radioligando.

Ensayos in Vitro en tejido deferente de ratón.

b) Actividad colinérgica.

Ensayos de inhibición.

Ensayos de competición.

c) Capacidad antioxidante.

Ensayos ORAC.

d) Toxicidad.

Test de Ames.

10.3. ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO TEÓRICO (*DOCKING*).

A) COMPLEJOS LIGANDO - CB2.

B) COMPLEJOS LIGANDO - BUCHE/ACHE.

10.4. CRISTALIZACIÓN.

10.1. QUÍMICA.

a) Métodos generales.

Todos los productos de partida utilizados en la síntesis fueron obtenidos de las casas comerciales Aldrich, Fluka, Acros y Alfa Aesar.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Reichert Jung Thermovar y no están corregidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ^1H -RMN fueron registrados en condiciones estándar por un equipo Bruker AVANCE 300 (300 MHz), Varian-INOVA 300 (300MHz) y Varian-INOVA 400 (400MHz). Los espectros de ^{13}C -RMN fueron registrados por un equipo Bruker AVANCE 300 (75 MHz). Las señales de RMN se encuentran detalladas para cada compuesto y fueron asignados según el esqueleto tipo de la figura 56.

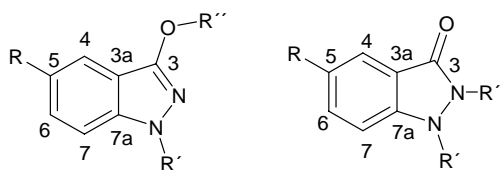


Figura 57. Esqueletos tipo de éter de indazolilo y 3-indazolona.

Los análisis elementales de los compuestos se hallan en el rango de $\pm 0,4$ respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se han realizado en el laboratorio de microanálisis del Centro de Química Orgánica “Manuel Lora-Tamayo” con un analizador Heareus CHN-O-RAPID.

Los análisis de HPLC-MS se realizaron en un aparato Waters, utilizando una columna de SurfiredTM C18 3,5 μm 4,6 x 50 mm y gradientes de acetonitrilo (0,08% ácido fórmico) / agua (0,1% ácido fórmico) que parten de la proporción especificada en cada caso y acaban en 100:0. El tiempo de gradiente utilizado

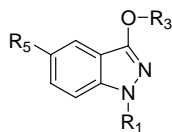
(tg) y el tiempo de retención del producto (tr) se especifica en cada caso. Los picos moleculares se midieron mediante un espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo en modo electrospray (ES).

En la purificación de los productos que requirió de separación mediante columna cromatográfica de media presión, se utilizó gel de sílice Merck 60 (230-400 Mesh). Los eluyentes y las proporciones empleadas se indican en cada caso.

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando placas cromatográficas de gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ (Merck), de un espesor de capa de 0,2 mm y se visualizaron por luz ultravioleta (254 y 365 nm).

b) Síntesis

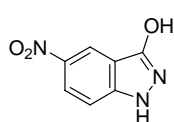
Tabla 21. Resumen y localización de los compuestos sintetizados.



Compuesto	R ₅	R ₁	R ₃	página
1	H	H	CH ₂ -4-metoxifenilo	161
2	H	H	CH ₂ -2-naftilo	162
3	H	metilo	CH ₂ -2-naftilo	171
4	H	piperidinoetilo	CH ₂ -2-naftilo	171
5	H	bencilo	CH ₂ -fenilo	167
6	H	4-metoxibencilo	CH ₂ -4-metoxifenilo	168
7	NO ₂	H	CH ₂ -4-metoxifenilo	163
8	NO ₂	H	CH ₂ -2-naftilo	164
9	NO ₂	metilo	CH ₂ -2-naftilo	172
10	NO ₂	piperidinoetilo	CH ₂ -2-naftilo	173
11	NO ₂	bencilo	CH ₂ -fenilo	168
12	NO ₂	bencilo	CH ₂ -2-naftilo	169
14	NO ₂	H	H	157
16	NO ₂	metilo	H	158
17	NO ₂	bencilo	H	159
18	NO ₂	metilo	CH ₂ -1-naftilo	170
19	NO ₂	CO ₂ Et	H	159
20	H	CO ₂ Et	H	160
21	NO ₂	H	CH ₂ -1-naftilo	165
22	H	H	CH ₂ -1-naftilo	166
23	NO ₂	propilo	CH ₂ -4-metoxifenilo	173
24	NO ₂	pentilo	CH ₂ -2-naftilo	174
25	NO ₂	morfolinoetilo	CH ₂ -2-naftilo	174
26	NO ₂	N-pirrodiniletilo	CH ₂ -1-naftilo	175
27	NO ₂	pentilo	CH ₂ -4-metoxifenilo	176
28	NO ₂	N-diisopropilaminoetilo	CH ₂ -4-metoxifenilo	176
29	H	N-diisopropilaminoetilo	CH ₂ -1-naftilo	177
30	H	N-pirrodiniletilo	CH ₂ -1-naftilo	178
31	H	piperidinoetilo	CH ₂ -1-naftilo	178
32	H	N-diisopropilaminoetilo	CH ₂ -4-metoxifenilo	179
33	NH ₂	bencilo	CH ₂ -fenilo	180
34	NH ₂	piperidinoetilo	CH ₂ -2-naftilo	181
35	NH ₂	propilo	CH ₂ -2-naftilo	181
36	NH ₂	N-pirrodiniletilo	CH ₂ -1-naftilo	182
37	Br	piperidinoetilo	CH ₂ -2-naftilo	183

1) Preparación del compuesto 5-nitro-1*H*-3-indazol-ol (14).

A una disolución de 12,00 g (59,7 mmol) de ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico en 200 mL de etanol se añaden 10 mL de hidrato de hidracina. Se mantiene a reflujo durante 7 horas. Se enfría la reacción y el sólido cristalizado se aísla por filtración, se lava con etanol absoluto y se seca al aire. El producto así obtenido se disuelve en 100 mL de H₂O, se acidula con ácido acético y se aísla por filtración el ácido 2-hidracino-5-nitrobenzoico precipitado. Se suspende este producto en 1 L de H₂O con 15 mL de HCl y se lleva a reflujo durante 30 minutos. Se deja enfriar, precipitando un sólido amarillo-anaranjado que se aísla por filtración. Se lava con H₂O y se seca al aire. Rendimiento: 77 % (8,21 g, 45,8 mmol)



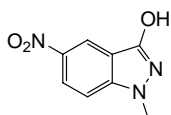
P.F.= 237 - 240 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ:12,35 (sa, 1H, OH); 11,25(s, 1H, NH); 8,65 (d, 1H,); 8,10 (dd, 1H, *J_o* = 9 Hz, *J_m*= 2 Hz, 6-H); 7,44 (d, 1H, *J_o*= 9 Hz, 7-H) **¹³C-RMN** (DMSO-d₆)δ: 157,5 (C3); 143,3 (C7a); 140,2 (C5); 122,0 (C6); 118,8 (C4); 111,5 (C3a); 111,0 (C7). **Anal.** (C₇H₅N₃O₃, P.M.: 179,13), % teórico (% experimental): C: 46,93 (46,85); H: 2,81 (2,83); N: 23,46 (23,52); **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN / H₂O 10:90, tr: 2,94, [M+H]⁺ = 179,7.

2) Preparación de indazoles sustituidos en la posición N-1.

Procedimiento general de obtención de 1-metilderivados. A una suspensión del derivado de 1*H*-3-indazolol correspondiente en acetona, se le añaden K₂CO₃ y yoduro de metilo. La suspensión resultante se lleva a reflujo y se mantiene con agitación, hasta que no se observa 3-indazolol de partida. Se lleva a sequedad, se añade agua básica (pH 14) y se extrae con cloroformo. Separamos la fase acuosa y evaporamos el disolvente de la fracción orgánica. Se redissuelve el sólido así obtenido en una disolución acuosa de HBr al 48%. Se mantiene la

suspensión formada durante 1 hora a 140 °C y, tras dejarla enfriar, se diluye con agua y se basifica con NaOH hasta pH = 14. Se extrae con cloroformo y juntamos la fase acuosa con la obtenida anteriormente. Acidulamos la fracción acuosa con HCl al 37%, precipitando así el producto deseado, que se recoge por filtración y se seca al aire.

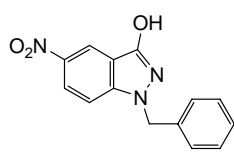
Preparación del 1-metil-5-nitro-3-indazolol (16)¹⁸⁷.



A partir de 1,07 g (6,0 mmol) de 5-nitro-1*H*-indazol-3-ol (**14**), 1,1 mL (17,7 mmol) de yoduro de metilo, 1,34 g (9,66 mmol) de K₂CO₃ y 30 mL de acetona. Tiempo de Reacción: 18 horas. Rendimiento: 0,68 g (76%).

P.F.= 271-273¹⁸⁷. 270-272 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 11,43 (sa, 1H, OH); 8,61 (d, 1H, 4-H); 8,10 (dd, 1H, 6-H); 7,56 (d, 1H, 7-H); 3,84 (s, 3H, CH₃); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 156,2 (C-3); 142,2 (C-7a); 139,7 (C-5); 121,4 (C-6); 118,5 (C-4); 111,3 (C-3a); 109,8 (C-7); 35,2 (CH₃). **Anal.** (C₈H₇N₃O₃, P.M.: 193,16), % calculado (% experimental) C: 49,74 (50,01); H: 3,65 (3,55); N: 21,75 (21,48). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 3,52, [M+H]⁺ = 194,0.

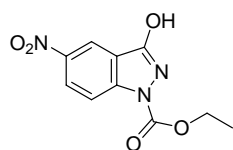
Procedimiento general de obtención de 1-bencilderivados. Se calienta una disolución del derivado de 3-indazolol en 5,4 mL de disolución acuosa de NaOH 1N a 50°C. Seguidamente se añaden 5,4 mmol del bromuro de bencilo deseado y la mezcla se calienta con agitación a 70 °C hasta alcanzar pH neutro (4 horas). Una vez frío, se aísla por filtración el sólido obtenido y se redisuelve en 50 mL de disolución acusa 0,25 N de NaOH con calefacción suave. El material insoluble se separa por filtración sobre papel. Se acidulan las aguas madres con ácido acético hasta pH 6 y se aísla mediante filtración el 1-bencil-derivado.

Preparación del 1-bencil-5-nitro-3-indazolol (17)¹⁹³.

A partir de 0,90 g (5,0 mmol) de 5-nitro-1*H*-indazol-3-ol (**14**), 0,64 mL (5,4 mmol) de bromuro de bencilo, y 5,4 mL de disolución acuosa 1N de NaOH. Tiempo de Reacción: 4 horas. Rendimiento: 1,04 g (89%).

P.F. = 251-254¹⁹³. 252-254 °C **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆) δ: 11,69 (sa, 1H, OH); 8,67 (s, 1H, 4-H); 8,14 (d, 1H, 7-H); 7,74 (dd, 1H, 6-H); 7,29-7,23 (m, 5H, Bn); 5,46 (s, 2H, CH₂). **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆) δ: 161,8 (C-3); 142,2 (C-7a); 139,9 (C-5); 137,1 (C-2'); 128,5 (2C, C-3'); 127,6 (C-5'); 127,4 (2C, C-4'); 121,8 (C-6); 118,7 (C-4); 112,0 (C-3a); 110,0 (C-7); 51,5 (CH₂). **Anal.** (C₁₄H₁₁N₃O₃, P.M.: 269,26) % calculado (% experimental) C: 62,45 (62,33); H: 4,12 (4,08); N: 15,61 (15,60). **HPLC-MS (ES⁺):** MeCN/H₂O 10:90 tg: 8 min; tr: 4,51, [M+H]⁺ = 270,0.

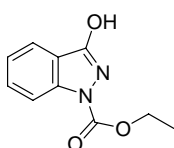
*Procedimiento general de obtención de 1-etoxicarbonil-derivados 1-etoxicarbonil-1*H*-3-indazolol.* A una disolución en piridina del derivado de 1*H*-3-indazolol correspondiente se le añade poco a poco cloruro de etoxicarbonilo en exceso. Se mantiene con agitación a temperatura ambiente hasta fin de reacción. Una vez finalizada la reacción se vierte la misma sobre agua, se lleva a pH ácido (4-5) con ácido acético y se deja precipitar durante una noche. Se filtra la suspensión así obtenida, se lava con agua y se seca al aire.

Preparación de 1-etoxicarbonil-5-nitro-3-indazolol (19).

A partir de 4,96 g (27,7 mmol) de 5-nitro-1*H*-indazol-3-ol (**14**), 3,0 mL (30,5 mmol) de cloruro de etoxicarbonilo y 30 mL de piridina. Tiempo de Reacción: 5 horas. Rendimiento: 6,50 g (94%).

P.F.=247-250 °C; (lit. 237 – 240 °C¹⁸⁸) **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ:12,61 (sa, 1H, OH); 8,57 (d, 1H, 4-H); 8,39 (dd, 1H, 6-H); 8,14 (d, 1H, 7-H); 4,43 (c, 2H, 3'-H); 1,77 (t, 3H, 4'-H). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆)δ: 159,1 (C-3); 150,1 (C-1'); 143,6 (C-5); 143,0 (C-7a); 125,2 (C-6); 117,7 (C-4); 117,4 (C-3a); 115,2 (C-7); 64,1 (C-3'); 14,4 (C-4') **Anal.** (C₁₀H₉N₃O₅, P.M.: 251,20) % calculado (% experimental): C: 47,81 (47,82); H: 3,61 (3,73); N: 16,73 (16,54). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 4,10, [M+H]⁺ = 252,0.

Preparación de 1-etoxicarbonil-3-indazolol (20)



A partir de 1,32 g (9,90 mmol) de 1-*H*-3-indazolol (**15**), 1,1 mL (11,2 mmol) de cloruro de etoxicarbonilo y 11,0 mL de piridina. Tiempo de Reacción: 7 horas. Rendimiento: 1,77 g (86%).

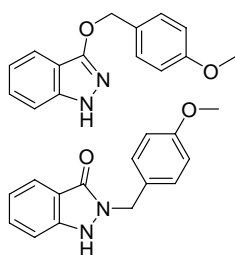
P.F. = 201 – 203 °C; (lit. 198 – 201 °C¹⁸⁸). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,11 (sa, 1H, OH); 8,03 (d, 1H, 4-H); 7,73 (d, 1H, 7-H); 7,60 (t, 1H, 5-H); 7,33 (t, 1H, 6-H); 4,39 (c, 2H, 3'-H); 1,35 (t, 3H, 4'-H). **¹³C-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 158,9 (C-3); 150,5 (C-1'); 140,7 (C-7a); 130,5 (C-6); 123,8 (C-5); 120,9 (C-4); 115,7 (C-3a); 114,5 (C-7); 63,3 (C-3'); 14,6 (C-4'); **Anal.** (C₁₀H₁₀N₂O₃, P.M.: 206,20) % calculado (% experimental): C: 58,25 (58,30); H: 4,89 (5,02); N: 13,59 (13,53). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 3,73, [M+H]⁺ = 207,2.

3) Preparación de éteres de indazol sin sustitución en la posición N-1 (1a, 2a, 7a, 8a, 21a, 22a) y sus correspondientes 3-indazolonas sustituidas en N-2 (1b, 2b, 7b, 8b, 21b, 22b).

Procedimiento general. A una suspensión del derivado 1-etoxicarbonil-1-*H*-3-indazolol en el disolvente adecuado, se le añaden K₂CO₃, el haluro correspondiente y una cantidad catalítica de KI. La suspensión resultante se lleva a reflujo y se mantiene con agitación hasta fin de reacción. El crudo de reacción

se lleva a sequedad, se añade agua y se extrae con cloroformo. La fase orgánica se lleva a sequedad y se añade una disolución de KOH en etanol 0,4 M. Se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la disolución se lleva a sequedad y se purifica el producto mediante columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla cloroformo : metanol (100:0 → 50:1). Los tiempos de reacción, así como las condiciones y tratamientos específicos se describen a nivel individual para cada compuesto.

Preparación de 3-(4-metoxibenciloxi)-1*H*-indazol (1a) y de 2-(4-metoxibenciloxi)-3-indazolona (1b)



A partir de una suspensión de 1,50 g (7,27 mmol) de 1-etoxicarbonil-3-indazolol (**20**), 1,3 mL (9,0 mmol) de bromuro de 4-metoxibencilo y 2,20 g (16,16 mmol) de K₂CO₃ en 100 mL de butanona. Tiempo de Reacción: 1 día. Rendimiento total: 1,01 g (80%). Rendimiento **1a**: 0,41 g (33%) Rendimiento **1b**: 0,60 g (47%).

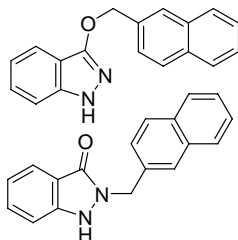
1a

P.F.=104-105 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,86 (s, 1H, N1-H); 7,70 (d, 1H, 4-H); 7,46 (d, 2H, 3''-H); 7,37 (t, 1H, 5-H); 7,30 (d, 1H, 7-H); 7,08 (t, 1H, 6-H); 6,93 (d, 2H, 4''-H); 5,38 (s, 2H, 1''-H); 3,83 (s, 3H, 7''-H). ¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 158,7 (C-5''); 157,6 (C-3); 142,6 (C-7a); 129,8 (2C,C-3''); 129,1 (C-2''); 127,8 (C-6); 120,0 (C-5); 119,8 (C-4); 113,9 (2C,C-4''); 112,9 (C-3a); 109,6 (C-7); 70,4 (C-1''); 55,3 (C-7'') **Anal.** (C₁₅H₁₄N₂O₂, P.M.: 254,28) % calculado (% experimental): C: 70,85 (70,57); H: 5,55 (5,41); N: 11,02 (10,91). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 4,23, [M+H]⁺ = 255,0.

1b

P.F. = 165 - 167°C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO) δ : 10,26 (sa, 1H, NH); 7,66 (d, 1H, 4-H); 7,48 (t, 1H, 5-H); 7,21 (d, 1H, 7-H); 7,20 (d, 2H, 5''-H); 7,09 (t, 1H, 6-H); 6,89 (d, 2H, 4''-H); 4,91 (s, 2H, 1''-H); 3,71 (s, 3H, CH₃). **¹³C-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ : 160,5 (C-3); 158,6 (C-5'); 145,9 (C-7a); 131,3 (C-2''); 129,1 (2C, C-3''); 128,7 (C-6); 122,9 (C-5); 120,1 (C-4); 117,0 (C-3a); 113,8 (2C, C-4''); 112,1 (C-7); 55,0 (C-1''); 46,2 (C-7''). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 3,69, [M+H]⁺ = 255,0.

Preparación de 3-(2-naftilmetoxi)-1*H*-indazol (PGN 66) y de 2-(2-naftilmetoxi)-1*H*-indazol (2b).



A partir de una suspensión de 0,84 g (4,08 mmol) de 1-etoxicarbonil-1*H*-indazol (**20**), 0,95 g (4,33 mmol) de bromuro de 2-naftilmetilo y 0,82 g (5,92 mmol) de K₂CO₃ en 150 mL de dioxano. Tiempo de Reacción: 23 h. Rendimiento total: 1,06 g (89%). Rendimiento **2a**: 0,55g (46 %) Rendimiento **2b**: 0,51 g (43 %).

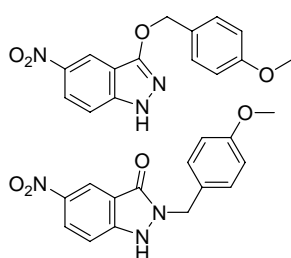
2a

P.F. = 114 -118 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO) δ : 11,98 (sa, 1H, N1-H); 7,65 (dd, 1H, 4-H); 7,34 (m, 2H, 5-H, 7-H); 7,02 (td, 1H, 6-H); 8,04 – 7,50 (m, 7H, Nf); 5,56 (s, 2H, 1''-H). **¹³C-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ : 155,5 (C-3); 141,7 (C-7a); 126,6 (C-6); 119,1 (C-5); 119,0 (C-4); 111,1 (C-3a); 110,0 (C-7); 69,9 (C-1''); 134,7; 132,7; 132,5; 127,9; 127,7; 127,5; 127,0; 126,2; 126,0; 125,9. **Anal.** (C₁₈H₁₄N₂O, P.M.: 274,32) % calculado (% experimental): C: 78,81 (79,02); H: 5,14 (5,30); N: 10,21 (10,42). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 5,51, [M+H]⁺ = 275,3.

2b

P.F.= 202 - 209 °C. **¹H-RMN** (300 MHz,DMSO) δ : 10,29 (sa, 1H, N1-H); 7,71 (d, 1H, 4-H); 7,50 (t, 1H, 5-H); 7,90 -7,40 (m, 7H, Nf); 7,21 (d, 1H, 7-H); 7,12 (t, 1H, 6-H); 5,16 (s, 2H, 1''-H). **¹³C-RMN** (300 MHz,CDCl₃) δ : 161,3 (C-3); 146,6 (C-7a); 128,7 (C-6); 123,5 (C-5); 121,3 (C-4); 117,5 (C-3a); 112,7 (C-7); 47,4 (C-1''); 134,8; 133,2; 132,8; 131,9; 128,0; 127,9; 126,8; 126,5; 126,2; **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 4,30, [M+H]⁺ = 275,3.

Preparación de 3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitro-1H-indazol (7a) y de 2-(4-metoxibenciloxi)-5-nitro-3-indazolona (7b).



A partir de una suspensión de 0,35 g (1,38 mmol) de 1-etoxicarbonil-5-nitro-1H-3-indazolol (**19**), 0,35 mL (2.5 mmol) de bromuro de 4-metoxibencilo y 0,26 g (1,85 mmol) de K₂CO₃ en 30 mL de butanona. Tiempo de Reacción: 1 día. Rendimiento total: 0,33 g (80%). Rendimiento **7a**: 0,12 g (30%) Rendimiento **7b**: 0,21 g (50%).

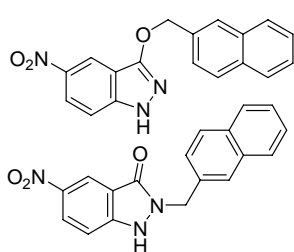
7a

P.F.= 129 – 132 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO) δ : 12,72 (sa, 1H, N1-H); 8,49 (d, 1H, 4-H); 8,15 (dd, 1H, 6-H); 7,53 (d, 1H, 7-H); 7,47 (d, 2H, 3''-H); 6,95 (d, 2H, 4''-H); 5,35 (s, 2H, 1''-H); 3,75 (s, 3H, 7''-H). **¹³C-RMN**: (300 MHz, DMSO) δ : 159,3 (C-5''); 157,6 (C-3); 143,1 (C-7a); 140,3 (C-5); 130,0 (2C, C-3''); 128,4 (C-2''); 122,0 (C-6); 117,4 (C-4); 113,8 (2C,C-4''); 110,9 (C-7); 110,6 (C-3a); 70,3 (C-1''); 55,1 (C-7''). **Anal.** (C₁₅H₁₃N₃O₄, P.M.: 299,28) % calculado (% experimental): C: 60,20 (70,57); H: 4,38 (4,49); N: 14,04 (13,97). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:100; tg: 5 min; tr: 3,91, [M+H]⁺ = 300,2.

7b

P.F. = 138– 140 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO): 12,02 (sa, 1H, N1-H); 8,52 (d, 1H, 4-H); 8,26 (s, 1H, 6-H); 7,35 (d, 1H, 7-H); 7,26 (d, 2H, 3''-H); 6,90 (d, 2H, 4''-H); 5,04 (s, 2H, 1''-H); 3,72 (s, 3H, 7''-H). **¹³C-RMN**: (300 MHz, DMSO) δ : 160,2 (C-3); 158,4 (C-5''); 145,6 (C-7a); 140,3 (C-5); 129,1 (2C, C-3''); 128,0 (C-2''); 126,0 (C-6); 120,5 (C-4); 114,0 (2C, C-4''); 111,9 (C-7); 111,6 (C-3a); 55,0 (C-1''); 46,4 (C-7''). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 3,91, [M+H]⁺ = 300,2.

Preparación de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1H-indazol (8a) y de 2-naftilmetil-5-nitro-3-indazolona (8b).



A partir de una suspensión de 1,96 g (7,81 mmol) de 1-etoxycarbonil-5-nitroindazol (**19**), 1,76 g (7,96 mmol) de bromuro de 2-naftilmetilo y 2,56 g (18,4 mmol) de K₂CO₃ en 60 mL de acetona. Tiempo de Reacción: 23 h. Rendimiento total: 2,12 (85%). Rendimiento **8a**: 0,90 g (36 %); rendimiento **8b**: 1,22 g (49%)

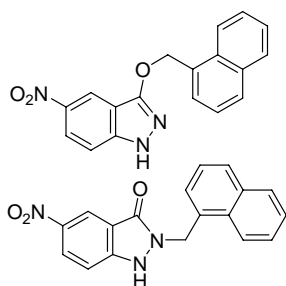
8a

P.F. = 131-134 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ : 9,27 (s, 1H, N1-H); 8,75 (d, 1H, 4-H); 8,27 (dd, 1H, 6-H); 7,50 (d, 1H, 7-H); 7,98 – 7,33 (m, 7H, Nf); 5,63 (s, 2H, 1''-H). **¹³C-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ : 158,8 (C-3); 143,7 (C-5); 141,7 (C-7a); 123,1 (C-6); 118,4 (C-4); 112,3 (C-3a); 109,8 (C-7); 71,2 (C-1''); 133,5; 133,2; 128,4; 128,0; 127,8; 127,1; 126,3; 125,6. **Anal.** (C₁₈H₁₃N₃O₃, P.M.: 319,31) % calculado (% experimental): C: 67,71 (67,53); H: 4,10 (4,34); N: 13,16 (12,98). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 5,53, [M+H]⁺ = 320,1.

8b

P.F. = 157 - 159 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO) δ : 12,04 (sa, 1H, NH); 8,53 (d, 1H, 4-H); 8,25 (dd, 1H, 6-H); 7,88–7,41 (m, 7H, Nf); 7,34 (d, 1H, 7-H); 5,26 (s, 2H, N2-CH₂). **¹³C-RMN** (300 MHz, DMSO) δ : 161,3 (C-3); 146,0 (C-5); 140,5 (C-7a); 126,2 (C-6); 120,7 (C-4); 114,4 (C-3a); 112,0 (C-7); 47,1 (N2-CH₂); 133,7; 132,8; 132,4; 128,4; 127,7; 127,6; 126,4; 125,6. **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 4,42, [M+H]⁺ = 320,2.

Preparación de 3-(1-naftilmetoxi)-5-nitro-1H-indazol (21a) y de 2-(1-naftilmetil)-5-nitro-3-indazolona (21b).



A partir de una suspensión de 0,90 g (3,58 mmol) de 1-etoxicarbonil-5-nitroindazol (**19**), 0,91 g (5,17 mmol) de cloruro de 1-naftilmetilo y 0,72 g (5,23 mmol) de K₂CO₃ en 60 mL de N,N'-dimetilformamida. Tiempo de Reacción: 23 h. Rendimiento Total: 0,72g (63%). Rendimiento **21a**: 0,59 g (52 %); rendimiento **21b**: 0,12 g (11%)

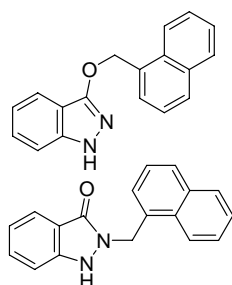
21a

P.F. = 204 - 210 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ : 12,65 (as, 1H, N1-H); 8,48 (d, 1H, 4-H); 7,77 (d, 1H, 7-H); 7,62 (dd, 1H, 6-H); 8,17–7,51 (m, 7H, Nf); 5,92 (s, 2H, 1'-H). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ : 157,6 (C-3); 143,4 (C-5); 140,2 (C-7a); 121,8 (C-6); 117,4 (C-4); 111,2 (C-7); 110,4 (C-3a); 68,9 (C-1'); 133,3; 132,0; 131,2; 129,0; 128,5; 127,3; 126,7; 126,0; 125,4; 123,7. **Anal.** (C₁₈H₁₃N₃O₃, P.M.: 319,31) % calculado (% experimental): C: 67,71 (67,62); H: 4,10 (4,39); N: 13,16 (12,96). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 5,74, [M+H]⁺ = 320,4.

21b

P.F. = 212 - 213 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 11,89 (sa, 1H, NH); 8,55 (s, 1H, 4-H); 8,25 (dd, 1H, 6-H); 7,88–7,48 (7H, Naft); 7,33 (d, 1H, 7-H); 5,54 (s, 2H, 1''-H). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 160,1 (C-3); 146,5 (C-5); 141,0 (C-7a); 123,8 (C-6); 121,0 (C-4); 112,5 (C-7); 102,4 (C-3a); 45,47 (N2-CH₂); 133,8; 131,7; 131,1; 129,2; 129,0; 127,7; 127,1; 126,5; 125,9. **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 15:95; tg: 8 min; tr: 4,53, [M+H]⁺ = 320,4.

Preparación de 3-(1-naftilmetoxi)-1H-indazol (22a) y de 2-(1-naftilmetoxi)-1H-indazol (22b).



A partir de una suspensión de 0,89 g (4,33 mmol) de 1-etoxicarbonil-3-indazolol (**20**), 0,76 g (4,34 mmol) de cloruro de 1-naftilmetilo y 1,64 g (11,7 mmol) de K₂CO₃ en 80 mL de butanona. Tiempo de Reacción: 2 días. Rendimiento total: 1,96 g (81%). Rendimiento **22a**: 1,69 g (70 %). Rendimiento **22b**: 0,27 g (11%)

22a

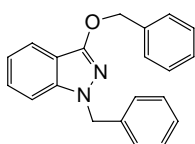
P.F. = 100-103 °C. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 12,00 (s, 1H, N1-H); 7,72 (d, 1H, 4-H); 7,52 (d, 1H, 7-H); 7,35 (t, 1H, 5-H); 6,98 (t, 1H, 6-H); 8,15 - 7,30 (m, 7H, Nf); 5,85 (s, 2H, 1''-H). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 155,6 (C-3); 141,8 (C-7a); 127,1 (C-6); 119,0 (2C, C-4, C-5); 111,1 (C-7); 110,1 (C-3a); 68,3 (C-1''); 133,3; 132,5; 131,3; 128,8; 128,5; 127,0; 126,5; 126,0; 125,4; 123,7. **Anal.** (C₁₈H₁₄N₂O, P.M.: 274,32) % calculado (% experimental): C: 78,81 (79,07); H: 5,14 (5,35); N: 10,21 (10,43). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 5,43, [M+H]⁺ = 275,2.

22b

P.F. = 149 - 151 °C. **¹H-RMN** (DMSO) δ : 10,29 (s, 1H, N1-H); 8,35 (d, 1H, 4-H); 7,32 (t, 1H, 5-H); 7,08 (d, 1H, 7-H); 6,91 (t, 1H, 6-H); 7,96 – 7,41 (m, 7H, Naph); 5,44 (s, 2H, CH₂). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ : 160,8 (C-3); 146,2 (C-7a); 126,3 (C-6); 122,9 (C-5); 118,7 (C-4); 115,3 (C-3a); 112,4 (C-7); 44,9 (C-1'); 133,2; 132,8; 130,8; 130,0; 128,4; 128,1; 127,0; 125,8; 125,3; 123,7. **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 4,24, [M+H]⁺ = 275,0.

4) Preparación de éteres de indazol sustituidos en la posición N-1.

Procedimiento general de obtención de derivados de éteres de 3-indazolino-1-sustituidos a partir de derivados de 1H-3-indazolol (5, 6 y 11). A una suspensión del derivado de 1H-3-indazolol y Cs₂CO₃ en acetona se le añade, una vez alcanzado el reflujo, el haluro correspondiente en exceso. Se evapora el disolvente y se purifica el producto mediante columna cromatográfica, usando como eluyente una mezcla cloruro de metileno : hexano (1:1 → 5:1).

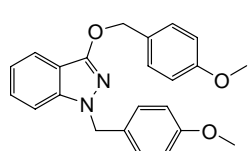
Preparación de 1-bencil-3-benciloxi-5-nitroindazol (5).

A partir de 0,05 g (0,38 mmol) de 1H-3-indazolol (**15**), 0,33 g de Cs₂CO₃ (1,02 mmol), 0,215 mL (0,90 mmol) de bromuro de bencilo y 60 ml de acetona. Tiempo de Reacción: 2 días. Rendimiento: 0,74 g (62%).

Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ : 7,76 (d, 1H, 4-H); 7,61 – 7,23 (m, 10H, 2Bn); 7,43 (d, 1H, 7-H); 7,39 (t, 1H, 5-H); 7,10 (t, 1H, 6-H); 5,52 (d, 2H, 1''-H); 5,48 (d, 2H, 1'-H); **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ : 156,3 (C-3); 142,1 (C-7a); 128,4 (C-6); 120,7 (C-5); 119,7 (C-4); 113,6 (C-3a); 109,3 (C-7); 71,2 (C-1''); 52,8 (C-1'); 137,9; 137,5; 129,0

(2C); 128,9 (2C); 128,6 (2C); 127,9 (2C); 127,5 (2C);. **Anal.** ($C_{21}H_{30}N_2O$, P.M.: 314,38) % calculado (% experimental): C: 80,23 (80,28); H: 5,77 (5,90); N: 8,91 (8,97). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 50:95; tg: 8 min; tr: 5,41, [M+H]⁺ = 315,1

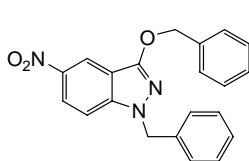
Preparación de 1-(4-metoxibencil)-3-(4-metoxibenciloxi)indazol (6).



A partir de 0,40 g (3,00 mmol) de 1*H*-3-indazolol (**15**), 1,95 g de Cs₂CO₃ (6,00 mmol), 0,95 mL (7,0 mmol) de cloruro de 4-metoxibencilo y 60 ml de acetona. Tiempo de Reacción: 2 días. Rendimiento: 0,68 g (60%).

Aceite. **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 7,65 (dd, 1H, 4-H); 7,45 (d, 2H, 3''-H); 7,30 (t, 1H, 5-H); 7,17 (dd, 1H, 7-H); 7,13 (d, 2H, 3'-H); 7,01 (t, 1H, 6-H); 6,91 (d, 2H, 4''-H); 6,81 (d, 2H, 4'-H); 5,36 (s, 2H, 1''-H); 5,34 (s, 2H, 1'-H); 3,82 (s, 3H, 7''-CH₃); 3,77 (s, 3H, 7'-CH₃). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 159,9 (C-5''); 159,4 (C-5'); 156,2 (C-3); 141,9 (C-7a); 129,9 (2C, C-3''); 129,6 (C-2''); 129,2 (C-2'); 128,4 (2C, C-3'); 127,2 (C-6); 120,1 (C-5); 119,0 (C-4); 113,9 (2C, C-4''); 113,8 (2C, C-4'); 113,2 (C-3a); 108,8 (C-7); 70,4 (C-1''); 55,3 (C-7''); 55,2 (C-7'); 51,9 (C-1'). **Anal.** ($C_{23}H_{22}N_2O_3$, P.M.: 374,43) % calculado (% experimental): C: 73,78 (73,93); H: 5,92 (6,10); N: 7,48 (7,59). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 20:100; tg: 20 min; tr: 15,18, [M+H]⁺ = 375,14.

Preparación de 1-bencil-3-benciloxi-5-nitroindazol (11).

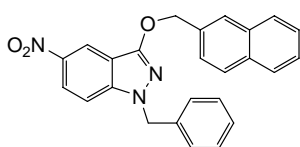


A partir de 0,33 g (1,85 mmol) de 5-nitro-1*H*-3-indazolol (**14**), 1,32 g de K₂CO₃ (14,05 mmol), 0,7 mL (4,00 mmol) de bromuro de bencilo y 60 ml de acetona. Tiempo de Reacción: 3 días. Rendimiento: 0,51 g (76%).

P.F.= 133-135 (1-propanol)¹⁹³; 129 – 132 °C (2-propanol). **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ : 8,53 (d, 1H, 4-H); 8,21 (dd, 1H, 6-H); 7,82 (d, 1H, 7-H); 7,54 – 7,20 (m, 10H, 2Bn); 5,56 (s, 2H, 1''-H); 5,44 (s, 2H, 1'-H). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ : 157,2 (C-3); 143,0 (C-7a); 141,0 (C-5); 122,8 (C-6); 118,0 (C-4); 111,6 (C-3a); 110,8 (C-7); 71,0 (C-1''); 52,2 (C-1'); 136,9; 136,2; 128,6 (2C); 128,4 (2C); 128,2 (2C); 128,1; 127,6; 127,3 (2C). **Anal.** (C₂₁H₁₇N₃O₃, P.M.: 359,38) % calculado (% experimental): C: 70,18 (69,97); H: 4,77 (4,70); N: 11,69 (11,65). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 6,10, [M+H]⁺=360,2.

Procedimiento general de obtención de derivados de éteres de 3-indazolilo-1-sustituídos a partir de derivados de 3-indazolol sustituidos en la posición 1 (12 y 18). A una suspensión del derivado de 3-indazolol sustituido en la posición 1 y K₂CO₃ en butanona se le añade el haluro correspondiente. Una vez finalizada la reacción, se deja enfriar y se filtra para eliminar las sales inorgánicas existentes en el medio. Se evapora el disolvente y se purifica el producto mediante columna cromatográfica utilizando el eluyente adecuado o mediante recristalización. Los tiempos de reacción, así como las condiciones y tratamientos específicos se describen a nivel individual para cada compuesto.

Preparación de 1-bencil-3-naftilmetoxi-5-nitroindazol (12).

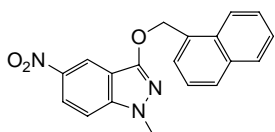


A una suspensión de 0,29 g (1,07 mmol) de 1-bencil-5-nitro-3-indazolol (**17**) y 0,65 g de Cs₂CO₃ (2,00 mmol), en 60 ml de acetona se le añaden 0,25 g (1,12 mmol) de bromuro de 2-naftilmetilo. Una vez

finalizada la reacción, se deja enfriar y se filtra para eliminar las sales inorgánicas existentes en el medio. Se evapora el disolvente y se purifica el producto mediante recristalización de 2-propanol. Tiempo de Reacción: 3 días. Rendimiento: 0,20 g (45%).

P.F. = 100 - 103 °C (2-propanol). **¹H-RMN** (DMSO-d₆) δ: 8,60 (d, 1H, 4-H); 8,22 (dd, 1H, 6-H); 7,83 (d, 1H, 7-H); 8,09 – 7,21 (m, 12H, Nf, y Bn); 5,62 (s, 2H, 1'-H); 5,56 (s, 2H, 1'-H). **¹³C-RMN** (DMSO-d₆) δ: 156,8 (C-3); 142,6 (C-7a); 140,6 (C-5); 122,4 (C-6); 117,7 (C-4); 112,8 (C-3a); 108,6 (C-7); 70,7 (C-1''); 51,8 (C-1'); 136,8; 133,8; 132,7; 132,6; 128,5 (2C); 128,0; 127,9; 127,6; 127,5; 127,3 (2C); 127,0; 126,3; 126,0. **Anal.** (C₂₅H₁₉N₃O₃, P.M.: 409,44) % calculado (% experimental): C: 73,34 (73,10); H: 4,68 (4,95); N: 10,26 (10,02). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 6,40, [M+H]⁺ = 410,3.

Preparación de 1-metil-3-(1-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (18).



A partir de 0,06 g (0,19 mmol) de 1-metil-5-nitro-3-indazolol (**16**), 1,212 g de K₂CO₃ (8,76 mmol), 0,1 mL (1,6 mmol) de yoduro de metilo y 60 ml de butanona.

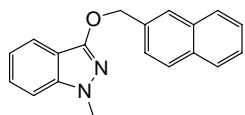
La elución del producto en la columna cromatográfica se realizó con la mezcla de disolventes cloruro de metileno : hexano (1:1 → 5:1). Tiempo de Reacción: 24 horas. Rendimiento: 0,04 g (67%).

P.F. = 152 – 155 °C. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,64 (d, 1H, 4-H); 8,24 (dd, 1H, 6-H); 7,56 (d, 1H, 7-H); 8,15 – 7,23 (m, 7H, Nf); 5,89 (s, 2H, O-CH₂); 3,99 (s, 3H, N1-CH₃). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 157,5 (C-3); 143,0 (C-7a); 140,8 (C-5); 122,6 (C-6); 118,7 (C-4); 112,0 (C-3a); 108,5 (C-7); 69,5 (C-1''); 35,6 (C-1'); 133,8; 131,7; 131,6; 129,4; 128,7; 127,8; 126,6; 126,0; 125,3. **Anal.** (C₁₉H₁₅N₃O₃, P.M.: 333,34) % calculado (% experimental) C: 68,46 (68,71); H: 4,36 (4,56); N: 12,61 (12,45). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90 tg: 8 min; tr: 6,00, [M+H]⁺ = 334,1.

Procedimiento general de obtención de derivados de éteres de 3-indazolilo-1-sustituídos a partir de derivados de éteres de 1H-indazolilo (3, 4, 9, 10, 23-32). A una suspensión del derivado de éter de 1H-indazolilo correspondiente y K₂CO₃ en butanona se le añade el haluro correspondiente. Una vez frío, se filtra

para eliminar las sales existentes en el medio, evapora el disolvente y se purifica el producto mediante columna cromatográfica utilizando el eluyente adecuado o mediante recristalización. Los tiempos de reacción, así como las condiciones y tratamientos específicos se describen a nivel individual para cada compuesto.

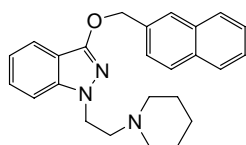
Preparación de 1-metil-3-(2-naftilmetoxi)-indazol (3).



A partir de 0,30 g (0,38 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-indazol (**2a**), 1,16 g de K_2CO_3 (8,4 mmol), 0,2 mL (3,2 mmol) de yoduro de metilo y 20 ml de butanona. La elución del producto en la columna cromatográfica se realizó con la mezcla de disolventes cloruro de metileno : hexano (1 : 2 \rightarrow 2 : 1) Tiempo de Reacción: 1 día. Rendimiento: 0,06 g (0,20 mmol) (52%).

Aceite. 1H -RMN ($DMSO-d_6$) δ : 7,66 (dt, 1H, 4-H); 7,49 (dt, 1H, 7-H); 7,39 (td, 1H, 7-H); 7,04 (td, 1H, 6-H); 8,06-7,52 (m, 7H, Nf); 5,55 (s, 2H, O-CH₂); 3,87 (s, 3H, CH₃). ^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ : 155,6 (C-3); 142,0 (C-7a); 126,8 (C-6); 120,1 (C-5); 118,9 (C-4); 112,5 (C-3a); 108,5 (C-7); 70,7 (C-1''); 35,1 (C-1'); 134,5; 133,3; 133,1; 128,2; 128,1; 127,7; 127,3; 126,1; 126,0; 125,8. **Anal.** ($C_{19}H_{16}N_2O$, P.M.: 288,34) % calculado (% experimental) C: 79,14 (78,96); H: 5,59 (5,48); N: 9,72 (9,81). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90, m tr: 6,03, $[M+H]^+ = 289,3$

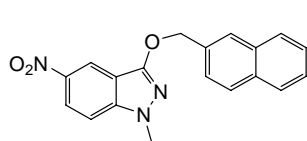
Preparación de 3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol (4).



A partir de 0,30 g (1,11 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-indazol (**2a**), 0,62 g de K_2CO_3 (4,49 mmol), 0,20 g (1,10 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina y 60 ml de butanona. La elución del producto en la columna cromatográfica se realizó con la mezcla de disolventes cloruro de metileno : metanol (100 : 0 \rightarrow 30 : 1) Tiempo de Reacción: 1 día. Rendimiento: 0,27 g (64%).

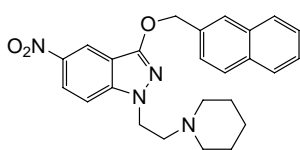
Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 7,68 (dd, 1H, 4-H); 7,35 (t, 1H, 5-H); 7,27 (dd, 1H, 7-H); 7,02 (t, 1H, 6-H); 7,98 - 7,25 (m, 7H, Nf); 5,59 (s, 2H, 1''-H); 4,35 (t, 2H, 1'-H); 2,79 (t, 2H, 2'-H); 2,46 (d, 4H, 4'-H); 1,55 (d, 4H, 5'-H); 1,41 (d, 2H, 6'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 155,6 (C-3); 141,6 (C-7a); 127,0 (C-6); 120,1 (C-5); 119,0 (C-4); 112,6 (C-3a); 108,7 (C-7); 70,7 (C-1''); 57,7 (C-1'); 54,7 (2C, C-4'); 46,3 (C-2'); 25,8 (2C, C-5'); 24,1 (C-6'); 134,6; 133,3; 133,1; 128,1; 128,0; 127,7; 127,2; 126,1; 126,0; 125,9. **Anal.** (C₂₅H₂₇N₃O, P.M.: 385,50) % calculado (% experimental): C: 77,89 (77,68); H: 7,06 (7,00); N: 10,90 (11,08). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 3,54, [M+H]⁺ = 386,3.

Preparación y obtención de 1-metil-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (9).



A partir de 0,15 g (3,93 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**8a**), 2,57 g de K₂CO₃ (18,57 mmol), 0,90 g (4,01 mmol) de yoduro de metilo y 60 ml de butanona. La elución del producto en la columna cromatográfica se realizó con la mezcla de disolventes cloruro de metileno : hexano (1:1 → 5:1). Tiempo de Reacción: 24 horas. Rendimiento: 0,10 g (58%).

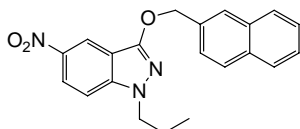
P.F. = 130 – 133 °C. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,72 (d, 1H, 4-H); 8,24 (dd, 1H, 6-H); 7,52 (d, 1H, 7-H); 7,98 – 7,23 (m, 7H, Nf); 5,60 (s, 2H, CH₂); 3,95 (s, 3H, CH₃). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 157,5 (C-3); 143,0 (C-7a); 140,9 (C-5); 122,6 (C-6); 118,7 (C-4); 112,0 (C-3a); 108,5 (C-7); 71,2 (C-1''); 35,6 (C-1'); 133,6; 133,2; 128,4; 128,0; 127,8; 127,1; 126,4; 126,3; 125,7. **Anal.** (C₁₉H₁₅N₃O₃, P.M.: 333,34) % calculado (% experimental) C: 68,46 (68,39); H: 4,36 (4,56); N: 12,61 (12,38). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 6,02, [M+H]⁺ = 334,1.

Preparación de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-(2-piperidinoetil)-indazol (10).

A partir de 0,21 g (0,67 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**8a**), 0,65 g de K_2CO_3 (4,71 mmol), 0,13 g (0,67 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina y 60 ml de butanona. El

sólido obtenido se purifica mediante recristalización en 2-propanol. Tiempo de Reacción: 72 horas. Rendimiento: 0,17 g (60%).

P.F. = 83 - 86 °C. **1H -RMN** ($CDCl_3$) δ : 8,70 (d, 1H, 4-H); 8,22 (dd, 1H, 6-H); 7,28 (d, 1H, 7-H); 7,98 - 7,49 (m, 7H, Nf); 5,60 (s, 2H, 1''-H); 4,32 (t, 2H, 1'-H); 2,77 (t, 2H, 2'-H); 2,39 (d, 4H, 4'-H); 1,48 (d, 4H, 5'-H); 1,39 (d, 2H, 6'-H). **^{13}C -RMN** ($CDCl_3$) δ : 157,5 (C-3); 143,1 (C-7a); 140,8 (C-5); 122,3 (C-6); 118,6 (C-4); 112,0 (C-3a); 109,0 (C-7); 71,2 (C-1''); 57,8 (C-1'); 54,7 (2C, C-4'); 46,3 (C-2'); 25,8 (2C, C-5'); 24,1 (C-6'); 133,7; 133,2; 128,3; 128,0; 127,7; 127,2; 126,3; 126,2; 125,8. **Anal.** ($C_{25}H_{26}N_4O_3$, P.M.: 430,50) % calculado (% experimental): C: 69,75 (69,58); H: 6,09 (5,94); N: 13,01 (12,99). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 5:95; tg: 20 min; tr: 12,54, $[M+H]^+ = 431,2$.

Preparación y obtención de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-propilindazol (23).

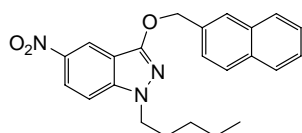
A partir de 0,17 g (0,52 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**8a**), 0,35 g de K_2CO_3 (2,53 mmol), 0,1 mL (1,02 mmol) de yoduro de propilo y 30 ml de butanona. La purificación se

realiza mediante recristalización de 2-propanol.. Tiempo de Reacción: 2 días. Rendimiento: 0,11 g (55%).

P.F. = 95 - 97 °C. **1H -RMN** ($CDCl_3$) δ : 8,71 (d, 1H, 4-H); 8,22 (dd, 1H, 6-H); 7,24 (d, 1H, 7-H); 7,99 - 7,48 (m, 7H, Nf); 5,61 (s, 2H, 1''-H); 4,19 (t, 2H, 1'-H); 1,94 (q,

2H, 2'-H); 0,92 (t, 3H, 3'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 157,8 (C-3); 142,1 (C-7a); 141,1 (C-5); 122,8 (C-6); 119,2 (C-4); 112,3 (C-3a); 108,9 (C-7); 71,5 (C-1''); 50,9 (C-1'); 23,4 (C-2'); 11,7 (C-3'); 134,1; 133,6; 128,7; 128,4; 128,1; 127,6; 126,7; 126,6; 126,2. **Anal.** (C₂₁H₁₉N₃O₃, P.M.: 361,39) % calculado (% experimental): C: 69,79 (69,65); H: 5,30 (5,44); N: 11,63 (11,48). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 15-95; tg: 8 min; tr: 6.91, [M+H]⁺ = 362,4

Preparación y obtención de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-pentilindazol (24).

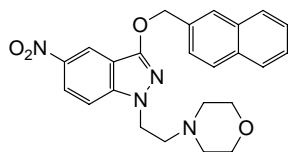


A partir de 0,21 g (0,67 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**8a**), 0,39 g (2,82 mmol) de K₂CO₃, 0,1 mL (0,77 mmol) de yoduro de pentilo y 60 ml de acetona. La elución del producto en la columna

cromatográfica se realizó con la mezcla de disolventes cloruro de metileno : hexano (1:1 → 5:1). Tiempo de Reacción: 5 días. Rendimiento: 0,10 g (58%).

P.F. = 83 - 84 °C. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,71 (d, 1H, 4-H); 8,22 (dd, 1H, 6-H); 7,99 – 7,49 (m, 7H, Nf); 7,24 (d, 1H, 7-H); 5,61 (s, 2H, 1''-H); 4,21 (t, 2H, 1'-H); 1,90 (q, 2H, 2'-H); 1,30 (m, 4H, 3' y 4'-H); 0,87 (t, 3H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 157,4 (C-3); 142,5 (C-7a); 140,8 (C-5); 122,4 (C-6); 118,8 (C-4); 111,9 (C-3a); 108,5 (C-7); 71,2 (C-1''); 49,0 (C-1'); 29,3 (C-2'); 28,9 (C-3'); 22,3 (C-4'); 13,9 (C-5'); 133,7; 133,2; 128,4; 128,0; 127,8; 127,2; 126,3; 126,2; 125,8. **Anal.** (C₁₉H₁₅N₃O₃, P.M.: 383,45) % calculado (% experimental): C: 70,93 (71,12); H: 5,95 (5,65); N: 10,79 (10,67). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 8 min; tr: 7,44, [M+H]⁺ = 390,4.

Preparación de 1-(2-morfolinoetil)-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (25).

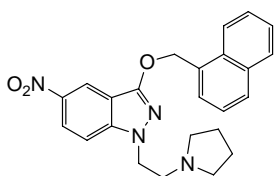


A partir de 0,09 g (0,27 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**8a**), 0,10 g de K₂CO₃ (0,73 mmol), 0,06 g (0,31 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)morfolina y 30 ml de butanona. El sólido

obtenido se purifica mediante recristalización en 2-propanol. Tiempo de Reacción: 96 horas. Rendimiento: 0,11 g (93%).

P.F. = 104 - 106 °C. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,71 (d, 1H, 4-H); 8,23 (dd, 1H, 6-H); 7,28 (d, 1H, 7-H); 7,98 – 7,49 (m, 7H, Nf); 5,60 (s, 2H, 1''-H); 4,34 (t, 2H, 1'-H); 3,58 (d, 4H, 4'-H); 2,82 (t, 2H, 2'-H); 2,43 (d, 4H, 5'-H); 1,39 (d, 2H, 6'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 157,5 (C-3); 143,1 (C-5); 140,9 (C-7a); 122,5 (C-6); 118,7 (C-4); 112,1 (C-3a); 108,8 (C-7); 71,2 (C-1''); 66,8 (2C, C-4'); 57,3 (C-1'); 53,7 (2C, C-5'); 46,7 (C-2'); 24,1 (C-6'); 133,6; 133,2; 128,4; 128,0; 127,7; 127,2; 126,4; 126,3; 125,7. **Anal.** (C₂₄H₂₄N₄O₄, P.M.: 432,47) % calculado (% experimental): C: 66,65 (66,38); H: 5,59 (5,46); N: 12,96 (13,12). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:100; tg: 5 min; 3,62, [M+H]⁺ = 433,15.

Preparación de 3-(1-naftilmetoxi)-5-nitro-1-(2-pirrolidinoetil)indazol (26).

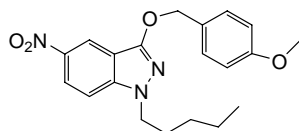


A una suspensión de 0,20 g (0,62 mmol) de 3-(1-naftilmetoxi)-5-nitroindazol (**21a**) y 0,28 g (2,00 mmol) de K₂CO₃ en 60 mL de butanona, se le añaden 0,17 g (1,00 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)pirrolidina. Se elimina el disolvente y se purifica el producto mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente la mezcla de disolventes cloruro de metileno : MeOH (1 : 0 → 30 : 1) Tiempo de Reacción: 60 horas. Rendimiento: 0,20 g (76%).

Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,64 (d, 1H, 4-H); 8,29 (dd, 1H, 6-H); 8,18 (dd, 1H, 9''-H); 7,51 (d, 1H, 7-H); 7,93 – 7,58 (m, 6H, Nf); 5,91 (s, 2H, 1''-H); 4,84 (t, 2H, 1'-H); 3,49 (s, 2H, 2'-H); 2,84 (m, 4H, 4'-H); 1,91 (m, 4H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 158,4 (C-3); 143,85 (C-7a); 142,1 (C-5); 123,9 (C-6); 118,8 (C-4); 112,2 (C-7); 110,2 (C3a); 69,9 (C-1'); 54,3 (2C, C-4'); 53,9 (C-1'); 45,8 (C-2'); 23,7 (2C, C-5'). **Anal.** (C₂₄H₂₄N₄O₃, P.M.: 416,48) % calculado. (% experimental) C: 69,21

(68,93); H: 5,81 (5,98); N: 13,45 (13,35). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 15:95; tg: 5 min; tr: 3,28, [M+H]⁺ = 417,4.

Preparación de 3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitro-1-pentilindazol (27).



A una suspensión de 0,21 g (0,71 mmol) de 3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitroindazol (**23a**) y 0,62 g (4,50 mmol) de K₂CO₃ en 60 mL de butanona, se le añaden 0,15 g (1,14 mmol) de yoduro de pentilo.

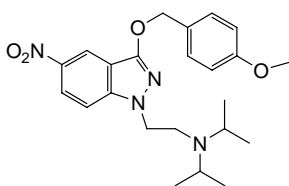
Se purifica el producto mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente la mezcla de disolventes cloruro de metileno : hexano (1:1 → 5:1).

Tiempo de Reacción: 72 horas. Rendimiento: 0,07 g (28%).

P.F. = 78 - 80 °C. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,66 (d, 1H, 4-H); 8,20 (dd, 1H, 6-H); 7,45 (d, 2H, 3''-H); 7,23 (d, 1H, 7-H); 6,93 (d, 2H, 4''-H); 5,36 (s, 2H, 1''-H); 4,20 (t, 2H, 1'-H); 3,83 (s, 3H, 7''-H); 1,89 (q, 2H, 2'-H); 1,30 (m, 4H, 3' y 4'-H); 0,88 (t, 3H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 159,8 (C-5''); 157,5 (C-3); 142,5 (C-7a); 140,7 (C-5); 130,1 (2C, C-3''); 128,4 (C-2''); 122,4 (C-6); 118,8 (C-4); 113,9 (2C, C-4''); 112,0 (C-3a); 108,4 (C-7); 70,9 (C-1''); 55,31 (C-7''); 48,9 (C-1'); 29,3 (C-2'); 28,9 (C-3'); 22,3 (C-4'); 13,9 (C-5'). **Anal.** (C₂₀H₂₃N₃O₄, P.M.: 369,42) % calculado (% experimental): C: 65,03 (65,40); H: 6,28 (6,07); N: 11,37 (11,15).

HPLC-MS (ES⁺): MeCN/H₂O 20:100; tg: 20 min; tr: 16,89, [M+H]⁺ = 370,3

Preparación de 3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitro-1-(2-diisopropilaminoetil) indazol (28).

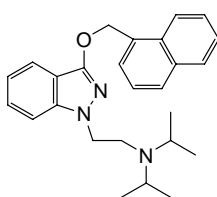


A una suspensión de 0,10 g (0,33 mmol) de 3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitroindazol (**23a**) y 0,13 g (0,90 mmol) de K₂CO₃ en 60 mL de butanona, se le añaden 0,07 g (0,33 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-

cloroetil)diisopropilamina. Se evapora el disolvente, se añade agua y se extrae con éter etílico. Se elimina el disolvente, y se purifica el producto mediante recristalización de 2-propanol / agua. Tiempo de Reacción: 6 horas. Rendimiento: 0,12 g (82%)

P.F. = 83-85 °C. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,63 (d, 1H, 4-H); 8,18 (dd, 1H, 6-H); 7,47 (d, 2H, 3''-H); 7,27 (d, 1H, 7-H); 6,93 (d, 2H, 4''-H); 5,37 (s, 2H, 1''-H); 4,17 (t, 2H, 1'-H); 3,83 (s, 3H, 7''-H); 2,95 (m, 2H, 4'-H); 2,85 (t, 2H, 2'-H); 0,91 (d, 12H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 160,2 (C-5''); 158,0 (C-3); 142,5 (C-7a); 140,7 (C-5); 130,1 (2C, C-3''); 129,4 (C-2''); 122,6 (C-6); 119,1 (C-4); 114,4 (2C, C-4''); 112,2 (C-3a); 109,5 (C-7); 70,9 (C-1''); 55,3 (C-7''); 50,5 (2C, C-4'); 48,9 (C-1'); 44,9 (C-2'); 20,8 (4C, C-5'). **Anal.** (C₂₃H₃₀N₄O₄, P.M.: 426,51) % calculado (% experimental): C: 64,77 (64,53); H: 7,09 (6,98); N: 13,14 (12,99). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 3,36, [M+H]⁺ = 427,3.

Preparación de 3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-diisopropilaminoetil) indazol (29).

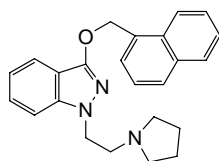


A una suspensión de 0,15 g (0,54 mmol) de 3-(1-naftilmetoxi)-indazol (**22a**) y 0,39 g (2,82 mmol) de K₂CO₃ en 60 mL de butanona se le añaden 0,12 g (0,59 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)diisopropilamina. La purificación del producto se realiza mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente la mezcla de disolventes cloruro de metileno: metanol (100 : 0 → 30 : 1). Tiempo de Reacción: 24 h. Rendimiento: 0,07 g (32%);

Acete. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,20 (dd, 1H, 9''-H); 7,72 (dd, 1H, 4-H); 7,60 (dd, 1H, 7-H); 7,33 (t, 1H, 5-H); 6,98 (t, 1H, 6-H); 7,91-7,47 (m, 6H, Nf); 5,88 (s, 2H, 1''-H); 4,20 (t, 2H, 1'-H); 3,02 (t, 2H, 2'-H); 2,85 (t, 2H, 4'-H); 0,99 (d, 12H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 155,6 (C-3); 141,7 (C-7a); 127,0 (C-6); 120,0 (C-5); 118,7 (C-4); 112,4 (C-3a); 108,8 (C-7); 69,1 (C-1''); 50,2 (2C, C-4'); 49,2 (C-1'); 44,9

(C-2'); 20,8 (4C, C-5'); 133,8; 132,8; 131,9; 129,0; 128,6; 127,2; 126,3; 125,8; 125,3; 124,1. **Anal.** (C₂₆H₃₁N₃O, P.M.: 401,54) % calculado (% experimental): C: 77,77 (77,53); H: 7,78 (7,61); N: 10,46 (10,22). **HPLC-MS (ES⁺):** MeCN/H₂O 10:100; tg: 5 min; tr: 3,66, [M+H]⁺ = 402,2.

Preparación de 3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-pirrolidinoetil)indazol (30).

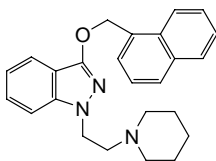


A una suspensión de 0,20 g (0,74 mmol) de 3-(1-naftilmetoxi)-indazol (**22a**) y 0,37 g (2,68 mmol) de K₂CO₃ en 60 mL de butanona se le añaden 0,14 g (0,79 mmol) de hidrocloreuro de 1-(2-cloroetil)pirrolidina. La purificación

del producto se realiza mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente la mezcla de disolventes cloruro de metileno : metanol (100 : 0 → 30 : 1). Tiempo de Reacción: 60 h. Rendimiento: 0,21 g (75%);

Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 7,71 (dd, 1H, 4-H); 7,47 (dd, 1H, 7-H); 7,36 (t, 1H, 5-H); 7,00 (t, 1H, 6-H); 7,91 - 7,40 (m, 7H, Nf); 5,87 (s, 2H, 1''-H); 4,44 (t, 2H, 1'-H); 3,05 (t, 2H, 2'-H); 2,63 (d, 4H, 4'-H); 1,80 (d, 4H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 155,8 (C-3); 141,6 (C-7a); 127,4 (C-6); 120,2 (C-5); 119,1 (C-4); 112,8 (C-3a); 108,7 (C-7); 69,1 (C-1''); 54,9 (C-1'); 54,3 (2C, C-4'); 47,6 (C-2'); 23,5 (2C, C-5'); 133,7; 132,7; 131,9; 129,0; 128,6; 127,1; 127,2; 126,4; 125,9; 125,3; 124,1. **Anal.** (C₂₄H₂₅N₃O, P.M.: 371,48) % calculado (% experimental): C: 77,60 (77,31); H: 6,78 (7,02); N: 11,31 (11,01). **HPLC-MS (ES⁺):** MeCN/H₂O 10:100; tg: 5 min; tr: 3,53, [M+H]⁺ = 372,3.

Preparación de 3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol (31).

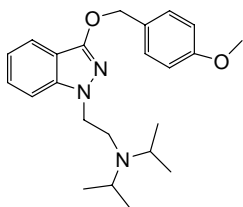


A partir de 0,30 g (1,11 mmol) de 3-(1-naftilmetoxi)-indazol (**22a**), 0,69 g de K₂CO₃ (5,00 mmol), 0,23 g (1,20 mmol) de hidrocloreuro de 1-(2-cloroetil)piperidina y 60 ml de butanona. La elución del producto en la columna cromatográfica se realizó con la mezcla de disolventes cloruro de metileno :

metanol (100 : 0 → 30 : 1) Tiempo de Reacción: 1 día. Rendimiento: 0,25 g (59%);

Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 8,18 (dd, 1H, 9''-H); 7,89 (d, 1H, 4-H); 7,62 (d, 1H, 7-H); 7,49 (t, 1H, 5-H); 7,00 (t, 1H, 6-H); 7,54 - 7,34 (m, 6H, Nf); 5,86 (s, 2H, 1''-H); 4,40 (t, 2H, 1'-H); 2,89 (t, 2H, 2'-H); 2,54 (m, 4H, 4'-H); 1,62 (m, 4H, 5'-H); 1,25 (m, 2H, 6'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 155,8 (C-3); 141,6 (C-7a); 127,1 (C-6); 120,1 (C-5); 119,1 (C-4); 112,7 (C-3a); 108,8 (C-7); 69,1 (C-1''); 57,5 (C-1'); 54,7 (2C, C-4'); 46,1 (C-2); 25,8 (2C, C-5'); 24,1 (C-6). **Anal.** (C₂₅H₂₇N₃O, P.M.: 385,50) % calculado (% experimental): C: 77,89 (77,71); H: 7,06 (7,29); N: 10,90 (10,84). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 20:100; tg: 15 min; tr: 9,57, [M+H]⁺ = 386.

Preparación de 1-(2-diisopropilaminoetil)-3-(4-metoxibenciloxi)indazol (32).



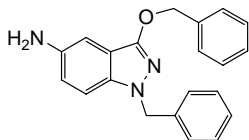
A partir de 0,19 g (0,8 mmol) de 3-(4-metoxibenciloxi)indazol (**1a**), 1,53 g de K₂CO₃ (11,0 mmol), 0,16 g (0,8 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)diisopropilamina y 60 ml de butanona. La elución del producto en la columna cromatográfica se

realizó con la mezcla de disolventes cloruro de metileno : metanol (100 : 0 → 30 : 1) Tiempo de Reacción: 60 horas. Rendimiento: 0,10 g (33%);

Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 7,63 (d, 1H, 4-H); 7,47 (d, 2H, 3''-H); 7,45 (d, 1H, 7-H); 7,32 (t, 1H, 5-H); 6,99 (t, 1H, 6-H); 6,92 (d, 2H, 4''-H); 5,36 (s, 2H, 1''-H); 4,16 (t, 2H, 1'-H); 3,01 (m, 2H, 4'-H); 2,81 (t, 2H, 2'-H); 0,98 (d, 12H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 159,5 (C-5''); 155,6 (C-3); 141,7 (C-7a); 130,0 (C-4''); 129,4 (C-2''); 126,9 (C-6); 120,0 (C-5); 118,6 (C-4); 113,8 (C-3''); 112,4 (C-3a); 108,8 (C-7); 70,9 (C-1''); 55,7 (C-7''); 50,6 (2C, C-4'); 49,6 (C-1'); 45,3 (C-2'); 21,2 (4C, C-5'). **Anal.** (C₂₃H₃₁N₃O₂, P.M.: 381,51) % calculado (% experimental): C: 72,41 (72,30); H: 8,19 (7,98); N: 11,01 (11,22). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 2,94, [M+H]⁺ = 179,7.

Procedimiento general de obtención de 5-aminoderivados de éteres de 3-indazolilo-1-sustituidos a partir de 5-nitroderivados de éteres de 3-indazolilo-1-sustituidos (derivados 33 - 36). A una suspensión del 5-nitroderivado de éter de 3-indazolilo-1-sustituido correspondiente y de catalizador $\text{FeO}(\text{OH})^{211}$ en metanol, se le añade hidracina monohidratada en exceso y se lleva a 60 - 70 °C en atmósfera de Argón. Una vez finalizada la reacción, se deja enfriar y se filtra sobre celita o papel de filtro para eliminar las impurezas y los restos del catalizador. Se evapora el disolvente y se realiza una extracción agua / cloroformo. Tras evaporar el disolvente orgánico se obtiene el producto. En caso de que el producto no se encuentre puro, éste se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente la mezcla de disolventes cloruro de metileno : metanol (100 : 0 \rightarrow 30 : 1). Los tiempos de reacción, así como las condiciones y tratamientos específicos se describen a nivel individual para cada compuesto.

Preparación de 5-amino-1-bencil-3-benciloxiindazol (33).

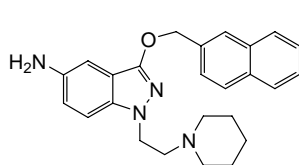


A partir de 0,22 g (0,6 mmol) de 1-bencil-3-(benciloxi)-5-nitro-1*H*-indazol (**11**), 0,05 g de $\text{FeO}(\text{OH})$ y 0,6 mL de hidracina monohidratada en 50 mL de metanol. Tiempo de reacción: 24 h. Rendimiento: 0,19 g (97%).

Aceite. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) δ : 7,24 (d, 1H, 7-H); 6,65 (d, 1H, 4-H); 6,77 (dd, 1H, 6-H); 7,48 – 7,11 (m, 10H, 2Bn); 5,32 (s, 2H, 1''-H); 5,30 (s, 2H, 1'-H); 4,80 (sa, 2H, NH_2). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d_6) δ : 153,7 (C-3); 141,9 (C-5); 136,3 (C-7a); 119,1 (C-6); 112,9 (C-3a); 110,1 (C-7); 99,6 (C-4); 69,8 (C-1''); 51,4 (C-1'); 138,2;

137,2; 128,3 (2C); 127,9 (2C); 127,8; 127,1 (2C); **Anal.** (C₂₁H₁₉N₃O, P.M.: 329,39) % calculado (% experimental): C: 76,57 (76,33); H: 5,81 (6,02); N: 12,76 (12,51). **HPLC-MS (ES⁺):** MeCN/H₂O 10:100; tg: 5 min; tr: 3,71, [M+H]⁺=330,2.

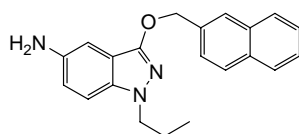
Preparación de 5-amino-3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol (34).



A partir de 0,10 g (0,25 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-(2-piperidinoetil) indazol (**10**), 0,02 g de FeO(OH) y 1,2 mL de hidracina monohidratada en 30 mL de metanol. Tiempo de reacción: 24 h. Rendimiento: 0,06 g (66%).

Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ: 7,11 (d, 1H, 7-H); 6,91 (d, 1H, 4-H); 6,83 (dd, 1H, 6-H); 7,96 – 7,47 (m, 7H, Nf); 5,54 (s, 2H, 1'-H); 4,27 (t, 2H, 1'-H); 3,26 (sa, 2H, NH₂); 2,73 (t, 2H, 2'-H); 2,42 (d, 4H, 4'-H); 1,56 (d, 4H, 5'-H); 1,41 (d, 2H, 6'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ: 154,9 (C-3); 139,2 (C-5); 137,7 (C-7a); 119,5 (C-6); 113,3 (C-3a); 109,9 (C-7); 103,2 (C-4); 71,0 (C-1''); 58,1 (C-1'); 55,0 (2C, C-4'); 46,7 (C-2'); 26,1 (2C, C-5'); 24,4 (C-6'). 135,0; 133,5; 133,2; 128,4; 128,3; 127,9; 127,1; 126,4; 126,3; 126,2; **Anal.** (C₂₅H₂₈N₄O, P.M.: 400,52) % calculado (% experimental): C: 74,97 (74,65); H: 7,05 (7,25); N: 13,99 (13,97). **HPLC-MS (ES⁺):** MeCN/H₂O 10:100; tg: 5 min; tr: 2,33, [M+H]⁺=401,2.

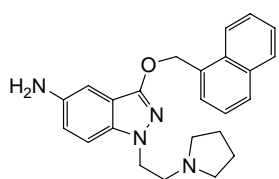
Preparación de 5-amino-3-(2-naftilmetoxi)-1-propilindazol (35).



A una disolución de 0,04 g (0,12 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-1-propil-5-nitroindazol (**23**), 0,01 g de FeO(OH) y 9 mL de hidracina monohidratada en 15 mL de metanol. Tiempo de Reacción: 3 horas. Rendimiento: 0,03 g (70%).

Aceite. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ : 7,09 (d, 1H, 7-H); 6,93 (d, 1H, 4-H); 6,85 (dd, 1H, 6-H); 7,97 – 7,47 (m, 7H, Nf); 5,56 (s, 2H, 1''-H); 4,10 (t, 2H, 1'-H); 3,18 (sa, 2H, NH₂) 1,86 (q, 2H, 2'-H); 0,89 (t, 3H, 3'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ : 153,5 (C-3); 137,8 (C-5); 136,4 (C-7a); 118,2 (C-6); 111,9 (C-3a); 108,5 (C-7); 102,0 (C-4); 69,7 (C-1''); 49,2 (C-1'); 22,2 (C-2'); 10,4 (C-3'); 133,8; 132,3; 132,1; 127,1; 127,0; 126,7; 125,9; 125,1; 125,0; 124,9. **Anal.** (C₂₁H₂₁N₃O, P.M.: 331,41) % calculado (% experimental): C: 76,11 (76,08); H: 6,39 (6,42); N: 12,68 (12,54). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 10:90; tg: 5 min; tr: 3,90, [M+H]⁺ = 333,1.

Preparación de 5-amino-3-(1-naftilmetoxy)-1-(2-pirrolidinoetil)indazol (36).

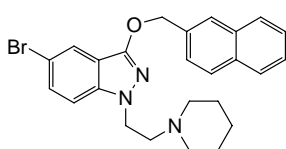


A partir de 0,08 g (0,20 mmol) de 3-(1-naftilmetoxy)-5-nitro-1-(2-pirrolidinoetil)indazol (**26**), 0,01 g de FeO(OH) y 3,5 mL de hidracina monohidratada en 30 mL de metanol bajo atmósfera de argon. Trás filtrar en celita y eliminar el disolvente, se añade H₂O y se acidula con ácido acético, precipitando un sólido naranja que se aísla por filtración. Tiempo de reacción: 30 h. Rendimiento: 0,06 g (85%).

P.F.: 136 – 138 °C. **¹H-RMN** (CDCl₃) δ : 7,16 (d, 1H, 7-H); 6,84 (d, 1H, 4-H); 6,83 (dd, 1H, 6-H); 8,18 – 7,45 (m, 7H, Nf); 5,87 (s, 2H, 1''-H); 4,37 (t, 2H, 1'-H); 3,57 (sa, 2H, NH₂); 3,01 (t, 2H, 2'-H); 2,61 (d, 4H, 4'-H); 1,78 (d, 4H, 5'-H). **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ : 154,8 (C-3); 139,1 (C-5); 137,5 (C-7a); 119,4 (C-6); 113,2 (C-3a); 109,6 (C-7); 102,9 (C-4); 69,0 (C-1''); 54,8 (C-1'); 54,2 (2C, C-4'); 47,5 (C-2'); 23,4 (2C, C-5'); 133,7; 132,8; 131,8; 128,9; 128,5; 127,0; 126,3; 125,8; 125,2; 124,1. **Anal.** (C₂₄H₂₆N₄O, P.M.: 386,49) % calculado (% experimental): C: 74.58 (74.45); H: 6.78 (7.01); N: 14.50 (13.97). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/H₂O 15:95; tg: 5 min; tr: 2,05, [M+H]⁺ = 387,4.

Procedimiento general de obtención de 5-bromoderivados de éteres de 3-indazolilo-1-sustituidos a partir de derivados de éteres de 3-indazolilo-1-sustituidos (derivado 37). A una disolución en acetonitrilo del éter de indazolilo correspondiente se le añade la cantidad necesaria de catalizador $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y se lleva a 80 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se le añade el reactivo halogenante y se mantiene en esas condiciones hasta fin de reacción. Una vez finalizada la reacción, se lleva a sequedad y se extrae con éter dietílico / agua. El producto se purifica finalmente mediante columna cromatográfica con la mezcla de eluyentes adecuada.

Preparación de 5-bromo-3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-(1-piperidinil)etil)indazol (37).



A partir de 0,09 g (0,24 mmol) de 3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-(1-piperidinoetil)indazol (**4**), 0,5 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,17 mmol), 0,04 g de N-bromosuccinimida y 20 ml de CH_3CN . Eluyente para la columna cromatográfica: cloruro de metileno a cloruro de metileno : metanol (10 : 1). Tiempo de Reacción: 40 min. Rendimiento: 0,03 g (27%).

Aceite. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) d: 7,83 (d, 1H, 4-H); 7,41 (dd, 1H, 6-H); 7,20 (dd, 1H, 6-H); 7,96-7,47 (m, 7H, Nf); 5,56 (s, 2H, 1''-H); 4,35 (t, 2H, 1'-H); 2,81 (t, 2H, 2'-H); 2,43 (d, 4H, 4'-H); 1,55 (d, 4H, 5'-H); 1,39 (d, 2H, 6'-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) d: 154,8 (C-3); 140,3 (C-7a); 130,3 (C-6); 122,6 (C-4); 114,1 (C-5); 111,8 (C-3a); 110,4 (C-7); 70,8 (C-1''); 57,5 (2C, C-1'); 54,7 (C-4'); 46,4 (C-2'); 25,5 (2C, C-5'); 23,9 (C-6'); 134,3; 133,2; 133,1; 128,2; 128,0; 127,7; 127,0; 126,2; 126,1; 125,8; Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{BrN}_3\text{O}$, P.M.: 464,40) % calculado (% experimental) C: 64,66 (64,37); H: 5,64 (5,91); N: 9,05 (8,87). **HPLC-MS (ES⁺)**: MeCN/ H_2O 5:80; tg: 20 min; tr: 15,28, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 464,1$.

10.2. FARMACOLOGÍA.

A) Actividad cannabinoide.

Ensayos de desplazamiento de radioligando.

La actividad cannabinoide de los nuevos éteres de indazolilo sintetizados fueron evaluados a nivel de su unión al receptor mediante ensayos de desplazamiento de ligando (binding) realizados. Estos ensayos han sido realizados por la Dra. Concepción Pérez y por María Gómez Cañas en los laboratorios del Dr. Julián Fernández- Ruíz en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Receptor CB1.

Los estudios de unión al receptor CB1 fueron realizados usando fracciones de membrana del receptor CB1 humano de células transfectadas (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). Las membranas HEK293EBNA fueron resuspendidas en tampón Tris (50 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.5 mg/mL BSA ácido graso libre, pH 7.4). Fracciones de la suspensión de membrana resultante (alrededor de 0,415 mg/mL de proteína) fueron incubadas a 30°C durante 90 min con 0,54 nM [³H]- CP55940 (139,6 Ci/mmol) en presencia de altas concentraciones del fármaco competidor, con un volumen final de 0,2 mL. Las uniones inespecíficas fueron determinadas en presencia de 10 µM WIN55212-2. Para minimizar las pérdidas de unión al receptor debidas a procesos de adsorción, se utilizaron tubos silanizados. La reacción fue finalizada por filtración a vacío rápida con un aparato Harvester (Perkin-Elmer) a través de Filtermat A GF/C humedecido en 0,05% polietilenimina (PEI). Los filtros fueron lavados 9 veces con el mismo tampón frío y la radioactividad de unión fue medida con un contador 1450 LSC & Luminescence Wallac Microbeta TriLux (Perkin-Elmer). El ensayo de desplazamiento mostró una sensibilidad apropiada para ligandos CB1. Así, el compuesto WIN55212-2 inhibió la unión del

radioligando con un valor de K_i de 36,2 nm. Para todos los experimentos, las curvas de unión competitiva fueron analizadas usando un proceso iterativo GraphPad (Prism), con el cual se obtuvieron los valores de IC_{50} de los compuestos ensayados. Los valores de K_i fueron determinados mediante el método de Cheng and Prusoff²³¹.

Receptor CB2.

Los estudios de unión al receptor CB2 fueron realizados usando fracciones de membrana del receptor CB2 humano de células transfectadas (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). Las membranas HEK293EBNA fueron resuspendidas en tampón Tris (50 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mg/mL BSA ácido graso libre, pH 7,4). Fracciones de la suspensión de membrana resultante (alrededor de 0,18 mg/mL de proteína) fueron incubadas a 30 °C durante 90 min con 0,33 nM [3H]- CP55940 (139,6 Ci/mmol) tanto en presencia de altas concentraciones del fármaco competidor como en ausencia del mismo, con un volumen final de 0,6 mL. Las uniones inespecíficas fueron determinadas en presencia de 10 μ M WIN55212-2. Para minimizar las pérdidas de unión al receptor debidas a procesos de adsorción, se utilizaron tubos silanizados. La reacción fue finalizada por filtración a vacío rápida con un aparato Harvester (Perkin-Elmer) a través de Filtermat A GF/C humedecido en 0,05% polietilenimina (PEI). Los filtros fueron lavados 9 veces con el mismo tampón frío y la radioactividad de unión fue medida con un contador 1450 LSC & Luminescence Wallac Microbeta TriLux (Perkin-Elmer). El ensayo de desplazamiento mostró una sensibilidad apropiada para ligandos CB2. Así, tanto WIN55212-2 como HU-308 inhibieron la unión con valores de K_d de 3,7 y 11,2 nm respectivamente. Para todos los experimentos, las curvas de unión competitiva fueron analizadas usando un proceso iterativo GraphPad (Prism), con el cual se obtuvieron los valores de IC_{50} de los compuestos ensayados. Los valores de K_i fueron determinados mediante el método de Cheng and Prusoff.²³¹

Ensayos *in vitro* en tejido deferente de ratón aislado.

La actividad cannabinoide de los nuevos éteres de indazolilo sintetizados fueron evaluados a nivel funcional, evaluando su efecto *in vitro* en ensayos en tejido deferente de ratón. Estos estudios fueron realizados en la Facultad de Medicina de la Universidad Rey Juan Carlos por el grupo de la Prof. Isabel Martín-Fontelles.

La actividad funcional de las moléculas de nueva síntesis se evaluó en ensayos *in vitro* en conducto deferente de ratón, un tejido donde frecuentemente se han estudiado y caracterizado efectos cannabinoides^{213, 232}.

En este tejido, los agonistas cannabinoides, actuando sobre receptores cannabinoides presinápticos, disminuyen la liberación de ATP y de noradrenalina desde la terminal nerviosa e inhiben las contracciones inducidas por estimulación eléctrica. Los antagonistas de los receptores cannabinoides de forma competitiva y superable, bloquean los efectos inhibitorios de los agonistas. El receptor cannabinoide que parece estar más implicado en este efecto es el CB₁^{92, 233, 234}. La metodología utilizada en este estudio ha sido la siguiente:

Se usaron ratones macho ICR, cuyos conductos deferentes se aislaron según la técnica descrita por Hughes,²³⁵ y se montaron en un baño de órganos. Se sometieron a periodos alternos de estimulación eléctrica (trenes de 5 pulsos rectangulares de 70 V, 15 Hz y 2 ms de duración cada uno, que se aplican a cada minuto) y de descanso (10 min). La fuerza isométrica se monitorizó utilizando un sistema de registro y análisis de datos MacLab.

El efecto agonista de los nuevos compuestos se evaluó realizando curvas concentración-respuesta no acumulativas (10^{-7} – $2,0 \times 10^{-5}$ M). Su efecto se comparó con el del agonista cannabinoide sintético no selectivo CB₁/CB₂ WIN55212-2 (Tabla 22). Para los compuestos que han presentado un perfil agonista interesante, se probó si su efecto es bloqueado y revertido por los antagonistas selectivos CB₁ (AM251) y/o CB₂ (AM630) (Tabla 23).

Tabla 22. Porcentaje de inhibición de la contracción inducida eléctricamente en tejido deferente de ratón causado por los compuestos **2-6, 8-12, 18, 21, 23-32, 34-37** y el ligando agonista de referencia WIN55212-2.

Compuesto	10^{-7} M	3×10^{-7} M	9×10^{-7} M	$2,7 \times 10^{-6}$ M	$8,1 \times 10^{-6}$ M	$2,0 \times 10^{-5}$ M
WIN55212-2	$8,4 \pm 1,8$	$19,6 \pm 3,0$	$36,5 \pm 3,4$	$49,0 \pm 4,0$	$67,2 \pm 3,9$	$81,4 \pm 3,4$
2	$3,5 \pm 5,8$	$5,5 \pm 6,8$	$10,9 \pm 6,3$	$24,2 \pm 5,0$	$31,3 \pm 4,7$	$43,5 \pm 4,0$
3	$-10,4 \pm 3,0$	$-7,1 \pm 2,9$	$-5,7 \pm 3,1$	$-6,6 \pm 4,2$	$-2,5 \pm 3,9$	$-6,8 \pm 5,5$
4	$2,9 \pm 1,1$	$8,7 \pm 1,8$	$12,0 \pm 5,0$	$40,0 \pm 9,3$	$82,6 \pm 3,2$	$95,5 \pm 1,4$
5	$0,5 \pm 2,5$	$5,6 \pm 3,6$	$9,8 \pm 5,2$	$13,9 \pm 4,9$	$17,2 \pm 5,0$	$19,6 \pm 5,8$
6	$-5,4 \pm 2,4$	$0,6 \pm 2,8$	$3,5 \pm 2,1$	$-2,1 \pm 2,6$	$-3,8 \pm 3,2$	$-1,8 \pm 5,4$
8	$4,2 \pm 3,6$	$10,0 \pm 6,8$	$25,0 \pm 10,4$	$29,8 \pm 9,9$	$37,6 \pm 11,2$	$47,9 \pm 8,5$
9	$-1,8 \pm 1,6$	$3,1 \pm 1,0$	$3,8 \pm 1,6$	$3,9 \pm 2,1$	$5,1 \pm 3,1$	$8,0 \pm 3,5$
10	$4,2 \pm 2,8$	$3,4 \pm 2,6$	$5,8 \pm 3,7$	$13,4 \pm 5,8$	$22,0 \pm 8,5$	$36,0 \pm 11,6$
11	$1,8 \pm 3,6$	$10,0 \pm 5,8$	$15,0 \pm 6,8$	$21,6 \pm 7,8$	$28,1 \pm 9,4$	$33,1 \pm 9,1$
12	$9,8 \pm 2,5$	$18,4 \pm 5,1$	$23,8 \pm 6,8$	$33,4 \pm 6,9$	$41,2 \pm 8,0$	$50,2 \pm 9,0$
18	$-2,0 \pm 2,0$	$1,5 \pm 0,6$	$6,8 \pm 4,3$	$8,7 \pm 5,5$	$9,8 \pm 5,7$	$12,2 \pm 7,6$
21	$-0,2 \pm 1,9$	$6,2 \pm 4,5$	$5,0 \pm 4,5$	$6,8 \pm 4,9$	$20,8 \pm 5,3$	$24,6 \pm 4,3$
23	$-0,8 \pm 1,2$	$1,7 \pm 2,1$	$3,3 \pm 2,6$	$5,1 \pm 3,1$	$4,9 \pm 4,0$	$7,9 \pm 4,6$
24	$0,6 \pm 1,2$	$8,6 \pm 9,4$	$12,9 \pm 11,7$	$11,7 \pm 12,6$	$9,5 \pm 9,5$	$12,1 \pm 11,0$
25	$-6,4 \pm 2,3$	$-1,2 \pm 2,9$	$6,5 \pm 3,1$	$9,2 \pm 3,9$	$20,6 \pm 5,2$	$38,5 \pm 6,4$
26	$2,4 \pm 0,8$	$6,2 \pm 1,0$	$9,0 \pm 1,9$	$14,3 \pm 2,6$	$30,4 \pm 3,7$	$51,4 \pm 5,2$
27	$-1,1 \pm 2,0$	$-2,1 \pm 2,5$	$-0,5 \pm 1,4$	$-1,0 \pm 3,5$	$-3,2 \pm 2,9$	$-4,0 \pm 4,7$
28	$0,3 \pm 2,0$	$0,8 \pm 4,3$	$7,6 \pm 2,8$	$7,3 \pm 3,8$	$9,4 \pm 3,3$	$14,0 \pm 2,4$
29	$1,0 \pm 2,0$	$3,3 \pm 2,2$	$4,3 \pm 1,9$	$4,1 \pm 3,7$	$14,3 \pm 3,7$	$27,0 \pm 4,8$
30	$-2,7 \pm 3,0$	$-0,4 \pm 3,4$	$4,8 \pm 4,2$	$20,6 \pm 5,8$	$70,7 \pm 3,8$	$81,7 \pm 4,6$
31	$-5,3 \pm 4,4$	$-2,2 \pm 4,8$	$10,3 \pm 4,9$	$26,0 \pm 6,8$	$73,9 \pm 2,6$	$90,1 \pm 1,3$
32	$7,5 \pm 2,1$	$8,5 \pm 2,4$	$18,6 \pm 3,6$	$43,1 \pm 3,3$	$74,7 \pm 3,4$	$86,4 \pm 1,9$
34	$0,9 \pm 2,1$	$6,4 \pm 3,4$	$21,1 \pm 3,2$	$41,4 \pm 3,1$	$60,9 \pm 3,0$	$80,8 \pm 3,6$
35	$3,8 \pm 1,0$	$10,7 \pm 2,4$	$17,3 \pm 4,7$	$23,0 \pm 6,4$	$29,6 \pm 8,4$	$38,8 \pm 11,5$
36	$-3,9 \pm 3,1$	$5,7 \pm 4,1$	$8,9 \pm 4,5$	$18,2 \pm 6,8$	$82,2 \pm 3,4$	$90,3 \pm 3,8$
37	$3,2 \pm 2,8$	$1,0 \pm 3,3$	$5,4 \pm 3,5$	$9,3 \pm 3,1$	$12,9 \pm 4,3$	$22,1 \pm 3,3$

Tabla 23. Porcentaje de inhibición de la contracción inducida eléctricamente en tejido deferente de ratón causado por los compuestos **32**, **34**, **31**, **4**, y el ligando agonista de referencia WIN55212-2 sólo o en presencia de los ligandos antagonistas selectivos AM251 (CB1) y/o AM630 (CB2).

	10⁻⁷ M	3x10⁻⁷ M	9x10⁻⁷ M	2,7x10⁻⁶ M	8,1x10⁻⁶ M	2,0x10⁻⁵ M
Vehículo (control)	0,0 ± 1,1	0,1 ± 1,8	0,1 ± 1,6	-2,0 ± 2,6	-0,1 ± 3,1	2,3 ± 3,7
WIN55212-2	8,4 ± 1,8	19,6 ± 3,0	36,5 ± 3,4	49,0 ± 4,0	67,2 ± 3,9	81,4 ± 3,4
WIN55212-2 + AM251 (10 ⁻⁶ M)	0,9 ± 0,9	4,5 ± 2,4	9,1 ± 3,1	26,8 ± 2,7	55,6 ± 3,4	74,5 ± 2,3
WIN55212-2 + AM251 (10 ⁻⁶ M) + AM630 (10 ⁻⁶ M)				27,1 ± 5,0		
4	3,1 ± 1,2	9,8 ± 3,2	20,1 ± 4,5	45,7 ± 5,9	78,6 ± 3,1	95,5 ± 2,1
4 + AM251 (10 ⁻⁶ M)	1,7 ± 4,1	9,7 ± 3,6	18,2 ± 5,9	32,8 ± 2,6	64,1 ± 8,7	82,9 ± 6,1
4 + AM251 (10 ⁻⁶ M) + AM630 (10 ⁻⁶ M)	-2,1 ± 3,4	1,6 ± 4,8	8,7 ± 5,3	20,2 ± 6,1	48,2 ± 4,6	79,3 ± 3,0
31	-5,3 ± 4,4	-2,2 ± 4,8	10,3 ± 4,9	26,0 ± 6,8	73,9 ± 2,6	90,1 ± 1,3
31 + AM251 (10 ⁻⁶ M)	6,6 ± 1,9	9,5 ± 2,1	15,2 ± 2,4	26,6 ± 5,3	59,3 ± 4,9	85,0 ± 4,5
31 + AM251 (10 ⁻⁶ M) + AM630 (10 ⁻⁶ M) +	-0,7 ± 2,1	1,9 ± 3,5	6,5 ± 4,1	14,9 ± 5,1	51,8 ± 5,2	78,4 ± 4,0
32	7,5 ± 2,1	8,5 ± 2,4	18,6 ± 3,6	43,1 ± 3,3	74,7 ± 3,4	86,4 ± 1,9
32 + AM251 (10 ⁻⁶ M)	-7,3 ± 2,4	-2,0 ± 5,5	12,1 ± 2,3	38,4 ± 5,9	72,7 ± 5,5	84,6 ± 5,7
32 + AM251 (10 ⁻⁶) + AM630 (10 ⁻⁶ M)	1,3 ± 1,6	8,2 ± 4,8	12,0 ± 4,7	20,3 ± 4,0	60,0 ± 4,4	84,0 ± 2,7
34	0,9 ± 2,1	6,4 ± 3,4	21,1 ± 3,2	41,4 ± 3,1	60,9 ± 3,0	80,8 ± 3,6
34 + AM251 (10 ⁻⁶ M)	2,3 ± 2,3	6,9 ± 4,2	15,7 ± 4,6	23,6 ± 5,4	62,2 ± 3,2	83,5 ± 2,2
34 + AM251 (10 ⁻⁶ M) + AM630 (10 ⁻⁶ M)	-2,6 ± 1,2	-1,1 ± 1,7	3,3 ± 3,3	13,0 ± 3,6	57,2 ± 3,5	80,5 ± 3,6

B) Actividad colinérgica.

Ensayos de Inhibición.

Para la determinación de la acción de los derivados de los compuestos como inhibidores de la AChE (Sigma Chemical Co., human recombinant), BuChE (Sigma Chemical Co., AChE de eritrocitos bovinos) y BuChE (Sigma Chemical Co., suero humano) se ha seguido el método de Ellman *et al.*²³ La solución de ensayo consiste en una solución tampón 0,1 M de fosfato sódico a pH 8,400 μ M de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), 0,05 unid. / ml AChE o 0,024 U/ml BuChE, y 800 μ M yoduro acetiltiocolina ó 500 μ M yoduro de butiriltiocolina como sustratos de AChE y BuChE, respectivamente. Los compuestos a ensayar se añaden a la solución de ensayo antes del enzima, una vez añadido el enzima se preincuba durante un periodo de 5 minutos a 30°C y por último se añade el sustrato. Los cambios de absorbancia a 412 nm se miden durante 5 minutos en un espectrofotómetro UV/Vis, Multiskan Spectrum. La actividad enzimática a cada concentración de compuesto se expresa como porcentaje de actividad con respecto al control en ausencia de compuesto. Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Concepción Pérez en el Instituto de Química Médica del CSIC.

Ensayos de Competición.

Para estudiar el mecanismo de acción de los compuestos frente a AChE y/o BuChE, se realizó un análisis cinético. Los experimentos se llevaron a cabo usando varias concentraciones del sustrato, así como varias concentraciones de inhibidor. Los resultados se representaron en graficas Lineweaver-Burk dobles-recíprocas. Los inhibidores competitivos tienen el mismo punto de corte en el eje y que la enzima sin inhibir. Los inhibidores no competitivos tienen el mismo punto de corte en el eje x que el enzima sin inhibir. La inhibición acompetitiva produce diferentes cortes en ambos ejes x e y. Los inhibidores mixtos producen puntos de corte arriba o debajo del eje x. Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Concepción Pérez en el Instituto de Química Médica del CSIC.

C) Capacidad antioxidante.

Ensayos ORAC.

Se determina mediante el método ORAC-FL de Ou *et al.*²¹⁶ parcialmente adaptado por BMG LABTECH²¹⁷. Hemos utilizado el lector de placas FLUOstar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Germany) con filtro de excitación a 485 nm y de emisión a 520 nm. Los compuestos 2, 2'-Azobis-(amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), ácido (±)-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromona-2-carboxílico (trolox) y fluoresceína (FL) se compraron a Sigma- Aldrich. La reacción se lleva a cabo en 75 mM buffer fosfato (pH 7.4) y un volumen final de reacción de 200 µL. El antioxidante (25 µL) y la fluoresceína (150 µL; 10 nM) se ponen en placas negras de 96 pocillos (Nunc.). La mezcla se preincuba durante 30 minutos a 37 °C y a continuación se añade rápidamente, con una pipeta multicanal, una solución de AAPH (25 µL, 240 mM). La microplaca se pone rápidamente en el lector y la fluorescencia se mide cada 90 segundos durante 90 min. La placa de 96 pocillos se agita automáticamente antes de cada lectura. Los compuestos se ensayan a 4 concentraciones diferentes (10-1 µM). También se pone un blanco (FL + AAPH en buffer fosfato) y como compuesto de referencia se ponen cuatro concentraciones de trolox (10-1 µM). Todas las reacciones se hacen por duplicado, y con al menos tres ensayos diferentes por compuesto. Los datos se exportan a una hoja de cálculo Excel (Microsoft), donde se representa la fluorescencia frente al tiempo y posteriormente se calcula el área bajo la curva siguiendo la fórmula (1)

$$(1) AUC = f_1 / f_0 + f_i / f_0 + \dots + f_{34} / f_0 + (f_{35} / f_0)$$

Donde: AUC = área bajo la curva

f_0 = Fluorescencia medida a tiempo 0

f_i = fluorescencia medida a tiempo t

Los valores netos de AUC de cada compuesto se determina restando al valor AUC del compuesto el valor AUC del blanco (FL + AAPH en buffer fosfato).

Los equivalentes relativos de trolox se calculan siguiendo la formula (2):

$$(2) \frac{(AUC_{\text{muestra}} - AUC_{\text{blanco}})}{(AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanco}})} * \frac{[Trolox]}{[muestra]}$$

Otra forma de obtener los equivalentes de trolox, es mediante la representación de los valores de AUC netos frente a las concentraciones del antioxidante. Así obtenemos las ecuaciones de regresión correspondientes a cada compuesto. Para calcular los equivalente de trolox aplicamos la siguiente formula (3)

$$(3) \text{ Equivalente de trolox} = \frac{\text{Pendiente de la recta de regresión de la muestra}}{\text{Pendiente de la recta de regresión del trolox}}$$

Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Concepción Pérez en el Instituto de Química Médica del CSIC.

D) Toxicidad.

Test de AMES.

El test preliminar de mutagenesis *Salmonella* fue realizado acorde al método descrito por Maron and Ames²¹⁸. En primer lugar, se determinó la dosis mínima tóxica (DMT, µg/placa) de los compuestos estudiados, para la bacteria *S. typhimurium* His⁻, TA98). La DMT determinada se selecciona para la dosis máxima a ensayar para cada compuesto. Para el ensayo, se preparó dos suspensiones 2 nM de *S. typhimurium*, una preincubada en condiciones estándar y otra con el sistema metabólico externo S9mix de hígado de ratón de origen comercial (Aroclor, de Moltox Inc., Annapolis, MD, USA), preparada según se describe en Ames *et al.*²³⁶. Los ensayos sin activación metabólica (sin S9mix) se realizaron mezclando 50 µL de cada disolución de sustancia a ensayar con 500 µL de buffer fosfato (0,1 M, pH=7,4) y 100 µL de suspensión bacteriana. Se hicieron 5 ensayos, partiendo de la dosis DMT en cada caso, a concentraciones sucesivas de un tercio de la condición anterior (DMT/3, DMT/9, DMT/27...). Tras 1 hora de incubación, se añaden 2 mL de agar fundido con histidina y biotina a 50 µM, se agita en vortex y se vierte sobre placa. Cuando el agar solidifica, las placas se vuelcan y se incuban a 37 °C durante 48 horas. Los ensayos con activación metabólica se realizaron de la misma forma, cambiando el buffer por la fracción S9mix (10%, v/v S9, 4,7 mM NADP, 6 mM D-glucosa-6-fosfato, 19 mM MgCl₂, 36 mM KCl, buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4). De cada condición se realizaron dos ensayos por separado. Se utilizaron dos controles, uno negativo, con el disolvente empleado (DMSO) y un control positivo, utilizando 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NPD, 20 µg / placa) para los ensayos en condiciones estándar y 2-aminofluoreno (10 µg / placa) en ensayos con activación metabólica (S9mix). Los controles fueron ensayados por duplicado en cada ensayo. Al final del experimento (48 horas), las colonias supervivientes fueron contadas visualmente. Para todos los ensayos, los datos se analizaron usando la regla "2 fold" modificada²³⁷, donde un compuesto es considerado mutagénico si la media de

colonias supervivientes es, al menos, el doble de las colonias supervivientes del control negativo, para dos o más concentraciones consecutivas (Tabla 24).

Estos ensayos fueron realizados en los laboratorios de los Dres. Hugo Cerecetto y Mercedes González en la Facultad de Química de la Universidad de la República de Uruguay

Tabla 24. Número de colonias supervivientes en medio carente de histidina en condiciones estándar y con activación metabólica (S9mix) en presencia de los compuestos **30**, **31** y **34**.

Compuesto	Concentración µg / placa	No revertientes estándar	No revertientes S9mix
30	20	0 ± 0	0 ± 0
	6,7	23 ± 0	19 ± 2
	2,2	15 ± 5	16 ± 1
	0,74	15 ± 1	21 ± 7
	0,25	16 ± 0	20 ± 4
31	20	16 ± 3	0 ± 0
	6,7	0 ± 0	25 ± 3
	2,2	9 ± 12	25 ± 3
	0,74	8 ± 11	27 ± 10
	0,25	0 ± 0	16 ± 2
34	40	18 ± 3	19 ± 4
	13	18 ± 3	20 ± 12
	4	13 ± 0	1 ± 1
	1	0 ± 0	10 ± 6
	0,5	0 ± 0	15 ± 2
Control (-)		10 ± 2	9 ± 3
Control (+)		1500	788

10.3. ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO TEÓRICO (*DOCKING*).

En general los fármacos presentan especificidad estructural, es decir, ejercen su efecto cuando interactúan con alguna macromolécula biológica. Conocida la diana terapéutica, teórica o experimentalmente, que está involucrada en el proceso biológico que es estudiado, se diseñan nuevos fármacos que van a ejercer su efecto sobre dicha diana.

En el proceso de *docking*, una vez analizado el sitio de unión de la diana, se busca la mejor interacción entre la diana y el posible ligando, pudiendo estudiar la energía de interacción. Las etapas de los estudios de anclaje son:

1. Construcción y optimización de los correspondientes ligandos
2. Procesamiento de la diana terapéutica.
3. Construcción y optimización inicial del complejo ligando-diana
4. Estudios de *docking*. Análisis y refinamiento

Todos los cálculos se realizaron en estaciones de trabajo Silicon Graphics. En primer lugar se construyeron los ligandos correspondientes empleando el módulo Sketch implementado en Sybyl 7.2¹³⁰. Se optimizaron con el campo de fuerzas MMFF94^{177, 178} y con el método de minimización de Gradiente conjugado, hasta alcanzar el gradiente $0,001 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$. Posteriormente, se construyeron manualmente los complejos receptor-ligando, teniendo en cuenta los modelos desarrollados en nuestro grupo y la información de la que disponemos sobre las distintas estructuras protéicas (CB2, AChE y BuChE).

Una vez situado manualmente el ligando en el centro activo, se minimizaron las cadenas laterales de la enzima y del ligando, dejando rígido el esqueleto de los receptores. Estos complejos receptor-ligando han sido la estructura de entrada para los estudios de *docking* con el programa Flexidock implementado en SYBYL.

Flexidock analiza todas las posibles conformaciones del ligando en el interior del centro activo del receptor estudiando tanto las cadenas laterales de los receptores como las conformaciones de los ligandos, es decir permite llevar a cabo un *docking* flexible tanto en el ligando como en el receptor. Flexidock emplea Algoritmos Genéticos (AG) que es un método muy rápido para la generación de conformaciones. A continuación se realizó la clasificación de las conformaciones en diferentes familias basándose en:

- i) Energía de unión calculada con Flexidock.
- ii) Concordancia entre los datos experimentales descritos del sitio de unión y los obtenidos en los modelos teóricos. El tipo de interacción fue examinada con el programa LPC²²⁰ (*Ligand Protein Contact*), que calcula todas las interacciones entre el receptor y el ligando.
- iii) Energía de interacción proteína-ligando (ΔG). Los efectos estructurales del sitio de unión de los ligandos en los complejos fueron analizados teniendo en cuenta el tipo de interacción entre ligando-receptor, las correspondientes energías de *docking*, así como los valores de la diferencia de la superficie accesible al disolvente (ΔSAD) del receptor libre y receptor- ligando. Basándonos en estos valores se puede calcular la energía libre ($\Delta G = RT \ln K_d$) y por lo tanto las constantes de asociación y disociación (K_a y K_d) del complejo receptor-ligando con el programa *Structural Thermodynamics Calculations*-*V4.3*¹⁸¹.

Los modelos cannabinoides que se emplearon para los estudios de *docking* han sido contruidos y refinados en nuestro grupo^{151, 176}. Se utilizaron los modelos de CB1 y CB2 en su forma activa (resultados sin publicar). En cuanto al sistema colinérgico los estudios se realizaron con la estructura 3D tanto de la AChE (código PDB: 1B41¹³¹) como de la BuChE humana (código PDB: 1P01¹³²).

Tabla 25. Contribución de los residuos que muestran cambios relevantes en la superficie accesible al disolvente (ΔASA) a la Energía de enlace (ΔG_{enlace}) de los complejos AChE–ligando.

Residuo	Donepezilo	Propidio	Edrofonio
Asp74	-0.30	-	-
Trp286	-0.63	-0.84	-
Tyr72	-0.03	-0.28	-
Tyr124	-0.48	-0.13	-0.21
Tyr337	-0.22	-	-0.20
Tyr341	-0.68	-0.75	0.10
Gly121	-0.26	-	-0.25
Trp86	-0.23	-	-0.10
His447	-0.01	-	-0.03

Tabla 26. Interacciones más importantes de los inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) edrofonio (competitivo), donepezilo (mixto) y propidio (no competitivo) con la enzima AChE.

Inhibidor	Sitio periférico (PAS)	Bolsillo de union acilo (ABP)	Agujero oxianiónico (OT)	Subsitio aniónico (AS)	Triada catalítica (CAS)
donepezilo	Trp286 (π - π) Tyr337 (π - π) Tyr341 (π - π)	Phe295 (EH, N-O24) Phe297 (π - π) Phe338 (CH- π)	Gly121 (Ph)	Trp86 (π - π)	His447 (Ph)
propidio	Trp286 (π - π) Tyr72 (π - π) Tyr341 (π - π)				
edrofonio			Gly122 (EH, N-O4)	Trp86 (π - π)	Ser203 (EH, OG-O4) His447 (EH, NE2-O4)

10.4. CRISTALIZACIÓN.

Tabla 27. Lista de estructuras de GPCR's publicadas.

Receptor	Resolución (Å)	Código PDB	Fecha	Ref.
Rhodopsin: bovine rod outer segment	2,8	1F88	06 / 00	141
Rhodopsin: bovine rod outer segment	2,6	1L9H	03 / 02	238
Rhodopsin: bovine rod outer segment	2,65	1GZM	05 / 02	239
Rhodopsin: bovine rod outer segment	2,2	1U19	07 / 04	142
Rhodopsin, photoactivated: bovine rod outer segment	3,8-4,15	2137	08 / 06	240
Rhodopsin: recombinant bovine rhodopsin mutant, N2C/D282C	3,4	2J4Y	09 / 06	241
Rhodopsin: squid	3,7	2ZIY	05 / 07	242
Rhodopsin: squid	2,5	2Z73	08 / 07	243
Human β 2 adrenergic receptor Fab5 complex. Complex with carazalol	3,4 / 3,7	2R4R	08 / 07	244
Human β 2 adrenergic receptor Fab5 complex. Complex with carazalol	3,4 / 3,7	2R4S	08 / 07	244
Human β 2 adrenergic receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with carazalol	2,4	2RH1	10 / 07	245
Opsin: bovine rod outer segment	2,9	3CAP	02 / 08	174
Turkey β 1 adrenergic receptor: StaR engineered for stability. Complex with cyanopindolol	2,7	2VT4	05 / 08	246
Human β 2 adrenergic receptor: T4 lysozyme replaces ICL3, E122W stability mutation. Complex with timolol	2,8	3D4S	05 / 08	247
Opsin in complex with a C-terminal peptide derived from the GR subunit of transducin	3,2	3DQB	07 / 08	143
Human adenosine A2A receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. In complex with antagonist ZM241385	2,6	3EML	09 / 08	247
Methylated β 2 adrenergic receptor: Fab complex	3,4	3KJ6	11 / 09	248

Receptor	Resolución (Å)	Código PDB	Fecha	Ref.
Human β 2 adrenergic receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with the inverse agonist ICI 118,551	2,84	3NY8	07 / 10	249
Human β 2 adrenergic receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with a novel inverse agonist	2,84	3NY9	07 / 10	249
Human β 2 adrenergic receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with alprenolol	3,16	3NYA	07 / 10	249
CXCR4 chemokine receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with a cyclic peptide antagonist CVX15	2,9	3OE0	08 / 10	250
CXCR4 chemokine receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with a small molecule antagonist IT1t	3,2	3OE6	08 / 10	250
CXCR4 chemokine receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with a small molecule antagonist IT1t	3,1	3OE8	08 / 10	250
CXCR4 chemokine receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with a small molecule antagonist IT1t	3,1	3OE9	08 / 10	250
CXCR4 chemokine receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with a small molecule antagonist IT1t	2,5	3ODU	08 / 10	250
Crystal structure of bovine rhodopsin with β -ionone	2,6	3OAX	08 / 10	251
Dopamine D3 receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with D2/D3-selective antagonist	2,89	3PBL	11 / 10	250
Human β 2 adrenergic receptor in active state stabilized with a nanobody: T4 lysozyme replaces ICL3	3,5	3POG	01 / 11	252
Human β 2 adrenergic receptor with irreversibly bound agonist T4 lysozyme replaces third intracellular loop	3,5	3PDS	01 / 11	253
Turkey β 1 adrenergic receptor: StaR engineered for stability. Complex with dobutamine	2,5	2Y00	01 / 11	254

Receptor	Resolución (Å)	Código PDB	Fecha	Ref.
Turkey β 1 adrenergic receptor: StaR engineered for stability. Complex with dobutamine	2,65	2Y01	01 / 11	254
Turkey β 1 adrenergic receptor: StaR engineered for stability. Complex with carmotorol	2,65	2Y02	01 / 11	254
Turkey β 1 adrenergic receptor: StaR engineered for stability. Complex with isoprenaline	2,85	2Y03	01 / 11	254
Turkey β 1 adrenergic receptor: StaR engineered for stability. Complex with salbutamol	3,05	2Y04	01 / 11	254
Bovine rhodopsin metarhodopsin II	3,00	3PXO	03 / 11	255
Bovine rhodopsin metarhodopsin II in complex with C-terminal fragment of GR (GRCT2)	2,85	3PQR	03 / 11	255
Constitutively active rhodopsin mutant with bound GR (GRCT2)	3,00	2X72	03 / 11	256
Human adenosine A2A receptor: T4 lysozyme replaces ICL3. Complex with the agonist UK-432097	2,7	3QAK	03 / 11	257
Agonist state human adenosine A2A receptor: StaR engineered for stability. Complex with adenosine	3,0	2YDO	03 / 11	228
Agonist state human adenosine A2A receptor: StaR engineered for stability. Complex with the agonist NECA	2,6	2YDV	03 / 11	228
Inverse agonist state human adenosine A2A receptor: StaR engineered for stability. Complex with ZM241385	3,29	3PWH	06 / 11	258
Inverse agonist state human adenosine A2A receptor: StaR engineered for stability. Complex with XAC	3,3	3REY	06 / 11	258
Inverse agonist state human adenosine A2A receptor: StaR engineered for stability. Complex with caffeine	3,6	3RFM	06 / 11	258

11. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html **2012**.
2. WHO. World Health Statistics 2008. www.who.int **2008**.
3. Gupta, M.; Kaur, H.; Grover, S.; Kukreti, R. Pharmacogenomics and treatment for dementia induced by Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 895-903.
4. Schneider, A.; Mandelkow, E. Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 443-457.
5. Martínez-Gil, A. *Medicinal Chemistry of Alzheimer's Disease*. **2008**.
6. Dohm, C. P.; Kermer, P.; Baehr, M. Aggregopathy in neurodegenerative diseases: Mechanisms and therapeutic implication. *Neurodegener. Dis.* **2008**, *5*, 321-338.
7. Lansbury, P. T., Jr. In pursuit of the molecular structure of amyloid plaque: new technology provides unexpected and critical information. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6865-70.
8. Goedert, M.; Spillantini, M. G. A century of Alzheimer's disease. *Science* **2006**, *314*, 777-81.
9. Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 347-72.
10. Villarroya, M.; García, A. G.; Marco-Contelles, J.; López, M. G. An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin. Inv. Drug* **2007**, *16*, 1987-98.
11. Klafki, H. W.; Staufenbiel, M.; Kornhuber, J.; Wiltfang, J. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* **2006**, *129*, 2840-55.
12. Coulthard, E.; Singh-Curry, V.; Husain, M. Treatment of attention deficits in neurological disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **2006**, *19*, 613-8.
13. Claassen, J. A.; Jansen, R. W. Cholinergically mediated augmentation of cerebral perfusion in Alzheimer's disease and related cognitive disorders: the cholinergic-vascular hypothesis. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2006**, *61*, 267-71.
14. Chohan, M. O.; Iqbal, K. From tau to toxicity: Emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2006**, *10*, 81-87.
15. Alzforum.org.
<http://www.alzforum.org/dis/tre/drc/default.asp?type=keyword&keyword=beta+secretase>.
16. Gravitz, L. Drugs: A tangled web of targets. *Nature* **2011**, *475*, S9-S11.

17. Salomone, S.; Caraci, F.; Leggio, G. M.; Fedotova, J.; Drago, F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *73*, 504-517.
18. Galimberti, D.; Scarpini, E. Progress in Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **2012**, *259*, 201-211.
19. Csermely, P.; Agoston, V.; Pongor, S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 178-82.
20. Bajda, M.; Guzik, N.; Ignasik, M.; Malawska, B. Multi-Target-Directed Ligands in Alzheimer's Disease Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4949-4975.
21. Alexander, S. P.; Kendall, D. A. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 602-23.
22. Campillo, N. E.; Paez, J. A. Cannabinoid System in Neurodegeneration: New Perspectives in Alzheimer's Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 539-559.
23. Scuderi, C.; De Filippis, D.; Iuvone, T.; Blasio, A.; Steardo, A.; Esposito, G. Cannabidiol in Medicine: A Review of its Therapeutic Potential in CNS Disorders. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 597-602.
24. Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned Cdna. *Nature* **1990**, *346*, 561-564.
25. Munro, S.; Thomas, K. L.; Abushaar, M. Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature* **1993**, *365*, 61-65.
26. Wagner, J. A.; Jarai, Z.; Batkai, S.; Kunos, G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *423*, 203-210.
27. Svizenska, I.; Dubovy, P.; Sulcova, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharmacol. Biochem. Be.* **2008**, *90*, 501-511.
28. Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Gong, J. P.; Patel, S.; Perchuk, A.; Meozzi, P. A.; Myers, L.; Mora, Z.; Tagliaferro, P.; Gardner, E.; Brusco, A.; Akinshola, B. E.; Liu, Q. R.; Hope, B.; Iwasaki, S.; Arinami, T.; Teasenfz, L.; Uhl, G. R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1074*, 514-536.
29. Fernández-Ruiz, J.; Romero, J.; Velasco, G.; Tolon, R. M.; Ramos, J. A.; Guzmán, M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 39-45.

30. ElSohly, M. A.; Slade, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* **2005**, *78*, 539-548.
31. Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* **1992**, *258*, 1946-1949.
32. Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol - a Possible Endogenous Cannabinoid Receptor-Ligand in Brain. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1995**, *215*, 89-97.
33. Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N. E.; Schatz, A. R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B. R.; Compton, D. R.; Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, Z. Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 83-90.
34. Hanus, L.; Abu-Lafi, S.; Fride, E.; Breuer, A.; Vogel, Z.; Shalev, D. E.; Kustanovich, I.; Mechoulam, R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3662-5.
35. Porter, A. C.; Sauer, J. M.; Knierman, M. D.; Becker, G. W.; Bernal, M. J.; Bao, J. Q.; Nomikos, G. G.; Carter, P.; Bymaster, F. P.; Leese, A. B.; Felder, C. C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 1020-1024.
36. Huang, S. M.; Bisogno, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T. J.; Krey, J. F.; Chu, C. J.; Miller, J. D.; Davies, S. N.; Geppetti, P.; Walker, J. M.; Di Marzo, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8400-8405.
37. Glass, M.; Northup, J. K. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 1362-9.
38. Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Mansouri, J.; Mackie, K.; Blond, O.; Lai, Y.; Ma, A. L.; Mitchell, R. L. Comparison of the Pharmacology and Signal-Transduction of the Human Cannabinoid Cb1 and Cb2 Receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443-450.
39. Childers, S. R.; Breivogel, C. S. Cannabis and endogenous cannabinoid systems. *Drug Alcohol Depend.* **1998**, *51*, 173-187.
40. Devane, W. A.; Dysarz, F. A., 3rd; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605-13.
41. Walther, S.; Halpern, M. Cannabinoids and Dementia: A Review of Clinical and Preclinical Data. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 2689 - 2708.

42. Pertwee, R. G.; Howlett, A. C.; Abood, M. E.; Alexander, S. P. H.; Di Marzo, V.; Elphick, M. R.; Greasley, P. J.; Hansen, H. S.; Kunos, G.; Mackie, K.; Mechoulam, R.; Ross, R. A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 588-631.
43. Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation Structure + Partial Synthesis of Active Constituent of Hashish *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1646-8.
44. Pertwee, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Delta(9)-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Delta(9)-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 199-215.
45. Costa, B. On the pharmacological properties of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC). *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1664-1677.
46. Iwamura, H.; Suzuki, H.; Ueda, Y.; Kaya, T.; Inaba, T. In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 420-5.
47. Pertwee, R. G.; Thomas, A.; Stevenson, L. A.; Maor, Y.; Mechoulam, R. Evidence that (-)-7-hydroxy-4'-dimethylheptyl-cannabidiol activates a non-CB1, non-CB2, non-TRPV1 target in the mouse vas deferens. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 1139-1146.
48. Thomas, A.; Baillie, G. L.; Phillips, A. M.; Razdan, R. K.; Ross, R. A.; Pertwee, R. G. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 613-623.
49. Mechoulam, R.; Peters, M.; Murillo-Rodriguez, E.; Hanus, L. O. Cannabidiol - Recent advances. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1678-1692.
50. María Martín-Moreno, A.; Reigada, D.; Ramirez, B. G.; Mechoulam, R.; Innamorato, N.; Cuadrado, A.; de Ceballos, M. L. Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation In Vitro and In Vivo: Relevance to Alzheimer's Disease. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 964-973.
51. Gareau, Y. D., Claude; Gallant, Michel; Rochette, Chantal; Sawyer, Nicole; Slipetz, Deborah M.; Tremblay, Nathalie; Weech, Philip K.; Metters, Kathleen M.; Labelle, Marc. Structure activity relationships of tetrahydrocannabinol analogs on human cannabinoid receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 189-94.
52. Little, P. J.; Compton, D. R.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Martin, B. R. Pharmacology and Stereoselectivity of Structurally Novel Cannabinoids in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, *247*, 1046-1051.
53. Little, P. J.; Compton, D. R.; Mechoulam, R.; Martin, B. R. Stereochemical Effects of 11-Oh-Delta-8-Thc-Dimethylheptyl in Mice and Dogs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1989**, *32*, 661-666.

54. Jarbe, T. U. C.; Hiltunen, A. J.; Mechoulam, R. Stereospecific of the discriminative stimulus functions of the dimethylheptyl homologs of 11-hydroxy-delta-8-tetrahydrocannabinol in rats and pigeons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *250*, 1000-1005.
55. Govaerts, S. J.; Hermans, E.; Lambert, D. M. Comparison of cannabinoid ligands affinities and efficacies in murine tissues and in transfected cells expressing human recombinant cannabinoid receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 233-243.
56. Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Little, M. D.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; de Costa, B. R.; Rice, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 1932-6.
57. Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; de Costa, B. R.; Rice, K. C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 563-83.
58. Huffman, J. W.; Zengin, G.; Wu, M. J.; Lu, J.; Hynd, G.; Bushell, K.; Thompson, A. L.; Bushell, S.; Tartal, C.; Hurst, D. P.; Reggio, P. H.; Selley, D. E.; Cassidy, M. P.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. Structure-activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles at the cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB(2) receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 89-112.
59. Huffman, J. W.; Yu, S.; Showalter, V.; Abood, M. E.; Wiley, J. L.; Compton, D. R.; Martin, B. R.; Bramblett, R. D.; Reggio, P. H. Synthesis and pharmacology of a very potent cannabinoid lacking a phenolic hydroxyl with high affinity for the CB2 receptor. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3875-3877.
60. Hanus, L.; Breuer, A.; Tchilibon, S.; Shiloah, S.; Goldenberg, D.; Horowitz, M.; Pertwee, R. G.; Ross, R. A.; Mechoulam, R.; Friede, E. HU-308: A specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 14228-14233.
61. Bell, M. R.; Dambra, T. E.; Kumar, V.; Eissenstat, M. A.; Herrmann, J. L.; Wetzel, J. R.; Rosi, D.; Philion, R. E.; Daum, S. J.; Hlasta, D. J.; Kullnig, R. K.; Ackerman, J. H.; Haubrich, D. R.; Luttinger, D. A.; Baizman, E. R.; Miller, M. S.; Ward, S. J. Antinociceptive (aminoalkyl)indoles. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1099-1110.
62. D'Ambra, T. E.; Estep, K. G.; Bell, M. R.; Eissenstat, M. A.; Josef, K. A.; Ward, S. J.; Haycock, D. A.; Baizman, E. R.; Casiano, F. M.; Beglin, N. C.; et al. Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 124-35.
63. Marriott, K. S. C.; Huffman, J. W. Recent advances in the development of selective ligands for the cannabinoid CB2 receptor. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 187-204.
64. Aung, M. M.; Griffin, G.; Huffman, J. W.; Wu, M. J.; Keel, C.; Yang, B.; Showalter, V. M.; Abood, M. E.; Martin, B. R. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB1 and CB2 receptor binding. *Drug Alcohol Depend.* **2000**, *60*, 133-140.

65. Gallant, M.; Dufresne, C.; Gareau, Y.; Guay, D.; Leblanc, Y.; Prasit, P.; Rochette, C.; Sawyer, N.; Slipetz, D. M.; Tremblay, N.; Metters, K. M.; Labelle, M. New class of potent ligands for the human peripheral cannabinoid receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2263-2268.
66. Yao, B. B.; Hsieh, G. C.; Frost, J. M.; Fan, Y.; Garrison, T. R.; Daza, A. V.; Grayson, G. K.; Zhu, C. Z.; Pai, M.; Chandran, P.; Salyers, A. K.; Wensink, E. J.; Honore, P.; Sullivan, J. P.; Dart, M. J.; Meyer, M. D. In vitro and in vivo characterization of A-796260: a selective cannabinoid CB2 receptor agonist exhibiting analgesic activity in rodent pain models. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 390-401.
67. Brizzi, A.; Brizzi, V.; Cascio, M. G.; Bisogno, T.; Sirianni, R.; Di Marzo, V. Design, synthesis, and binding studies of new potent ligands of cannabinoid receptors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7343-7350.
68. Huffman, J. W.; Padgett, L. W.; Isherwood, M. L.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. 1-Alkyl-2-aryl-4-(1-naphthoyl)pyrroles: New high affinity ligands for the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5432-5435.
69. Wroblewski, S. T.; Chen, P.; Hynes, J.; Lin, S. Q.; Norris, D. J.; Pandit, C. R.; Spergel, S.; Wu, H.; Tokarski, J. S.; Chen, X. R.; Gillooly, K. M.; Kiener, P. A.; McIntyre, K. W.; Patil-Koota, V.; Shuster, D. J.; Turk, L. A.; Yang, G. C.; Leftheris, K. Rational design and synthesis of an orally active indolopyridone as a novel conformationally constrained cannabinoid ligand possessing antiinflammatory properties. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2110-2116.
70. Ferrarini, P. L.; Calderone, V.; Cavallini, T.; Manera, C.; Saccomanni, G.; Pani, L.; Ruii, S.; Gessa, G. L. Synthesis and biological evaluation of 1,8-naphthyridin-4(1H)-on-3-carboxamide derivatives as new ligands of cannabinoid receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1921-1933.
71. Ermann, M.; Riether, D.; Walker, E. R.; Mushi, I. F.; Jenkins, J. E.; Noya-Marino, B.; Brewer, M. L.; Taylor, M. G.; Amouzegh, P.; East, S. P.; Dymock, B. W.; Gemkow, M. J.; Kahrs, A. F.; Ebner, A.; Lobbe, S.; O'Shea, K.; Shih, D. T.; Thomson, D. Arylsulfonamide CB2 receptor agonists: SAR and optimization of CB2 selectivity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1725-1729.
72. Verbist, B. M. P.; De Cleyn, M. A. J.; Surkyn, M.; Fraiponts, E.; Aerssens, J.; Nijssen, M.; Gijzen, H. J. M. 5-sulfonyl-benzimidazoles as selective CB2 agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2574-2579.
73. Manera, C.; Benetti, V.; Castelli, M. P.; Cavallini, T.; Lazzarotti, S.; Pibiri, F.; Saccomanni, G.; Tuccinardi, T.; Vannacci, A.; Martinelli, A.; Ferrarini, P. L. Design, synthesis, and biological evaluation of new 1,8-naphthyridin-4(1H)-on-3-carboxamide and quinolin-4(1H)-on-3-carboxamide derivatives as CB2 selective agonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5947-5957.

74. Stern, E.; Muccioli, G. G.; Millet, R.; Goossens, J. F.; Farce, A.; Chavatte, P.; Poupaert, J. H.; Lambert, D. M.; Depreux, P.; Henichart, J. P. Novel 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide derivatives as new CB2 cannabinoid receptors agonists: Synthesis, pharmacological properties and molecular modeling. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 70-79.
75. Gonsiorek, W.; Lunn, C. A.; Fan, X.; Deno, G.; Kozlowski, J.; Hipkin, R. W. Sch35966 is a potent, selective agonist at the peripheral cannabinoid receptor (CB2) in rodents and primates. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 1262-1271.
76. Kai, H.; Morioka, Y.; Tomida, M.; Takahashi, T.; Hattori, M.; Hanasaki, K.; Koike, K.; Chiba, H.; Shinohara, S.; Kanemasa, T.; Iwamoto, Y.; Takahashi, K.; Yamaguchi, Y.; Baba, T.; Yoshikawa, T.; Takenaka, H. 2-Arylimino-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazines as a new class of cannabinoid receptor agonists. Part 2: Orally bioavailable compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3925-3929.
77. Kai, H.; Morioka, Y.; Murashi, T.; Morita, K.; Shinonome, S.; Nakazato, H.; Kawamoto, K.; Hanasaki, K.; Takahashi, F.; Mihara, S. I.; Arai, T.; Abe, K.; Okabe, H.; Baba, T.; Yoshikawa, T.; Takenaka, H. 2-arylimino-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazines as a new class of cannabinoid receptor agonists. Part 1: Discovery of CB2 receptor selective compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4030-4034.
78. Giblin, G. M. P.; O'Shaughnessy, C. T.; Naylor, A.; Mitchell, W. L.; Eatherton, A. J.; Slingsby, B. P.; Rawlings, D. A.; Goldsmith, P.; Brown, A. J.; Haslam, C. P.; Clayton, N. M.; Wilson, A. W.; Chessell, I. P.; Wittington, A. R.; Green, R. Discovery of 2-[(2,4-Dichlorophenyl)amino]-N-[(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl]-4-(trifluoromethyl)-5-pyrimidinecarboxamide, a selective CB2 receptor agonist for the treatment of inflammatory pain. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2597-2600.
79. Silvestri, R.; Cascio, M. G.; La Regina, G.; Piscitelli, F.; Lavecchia, A.; Brizzi, A.; Pasquini, S.; Botta, M.; Novellino, E.; Di Marzo, V.; Corelli, F. Synthesis, cannabinoid receptor affinity, and molecular modeling studies of substituted 1-aryl-5-(1H-pyrrol-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamides. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1560-1576.
80. Savinainen, J. R.; Kokkola, T.; Salo, O. M. H.; Poso, A.; Jarvinen, T.; Laitinen, J. T. Identification of WIN55212-3 as a competitive neutral antagonist of the human cannabinoid CB2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 636-645.
81. Salamone, J. D.; McLaughlin, P. J.; Sink, K.; Makriyannis, A.; Parker, L. A. Cannabinoid CB1 receptor inverse agonists and neutral antagonists: Effects on food intake, food-reinforced behavior and food aversions. *Physiol. Behav.* **2007**, *91*, 383-388.
82. Raitio, K. H.; Savinainen, J. R.; Nevalainen, T.; Jarvinen, T.; Vepsäläinen, J. Synthesis and in vitro evaluation of novel 2-oxo-1,2-dihydroquinoline CB2 receptor inverse agonists. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *68*, 334-340.
83. Pertwee, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* **2005**, *76*, 1307-1324.

84. Muccioli, G. G. Blocking the cannabinoid receptors: Drug candidates and therapeutic promises. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1805-1827.
85. Lunn, C. A.; Reich, E. P.; Fine, J. S.; Lavey, B.; Kozlowski, J. A.; Hipkin, R. W.; Lundell, D. J.; Bober, L. Biology and therapeutic potential of cannabinoid CB2 receptor inverse agonists. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 226-239.
86. Jagerovic, N.; Fernandez-Fernandez, C.; Goya, P. CB1 cannabinoid antagonists: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 205-230.
87. Shire, D.; Calandra, B.; Bouaboula, M.; Barth, F.; Rinaldi-Carmona, M.; Casellas, P.; Ferrara, P. Cannabinoid receptor interactions with the antagonists SR 141716A and SR 144528. *Life Sci.* **1999**, *65*, 627-635.
88. Rinaldicarmona, M.; Barth, F.; Heaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Neliat, G.; Caput, D.; Ferrara, P.; Soubrie, P.; Breliere, J. C.; Lefur, G. Sr141716a, a Potent and Selective Antagonist of the Brain Cannabinoid Receptor. *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240-244.
89. Bifulco, M.; Grimaldi, C.; Gazzerro, P.; Pisanti, S.; Santoro, A. Rimonabant: Just an Antiobesity drug? Current evidence on its pleiotropic effects. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 1445-1456.
90. Barth, F.; Rinaldi-Carmona, M. The development of cannabinoid antagonists. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 745-755.
91. Lan, R. X.; Liu, Q.; Fan, P. S.; Lin, S. Y.; Fernando, S. R.; McCallion, D.; Pertwee, R.; Makriyannis, A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 769-776.
92. Pertwee, R.; Griffin, G.; Fernando, S.; Li, X. Y.; Hill, A.; Makriyannis, A. Am630, a Competitive Cannabinoid Receptor Antagonist. *Life Sci.* **1995**, *56*, 1949-1955.
93. Campbell, V. A.; Gowran, A. Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 655-662.
94. Tolón, R. M.; Nuñez, E.; Pazos, M. R.; Benito, C.; Castillo, A. I.; Martínez-Orgado, J. A.; Romero, J. The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain Res.* **2009**, *1283*, 148-54.
95. Ramirez, B. G.; Blazquez, C.; Gomez del Pulgar, T.; Guzman, M.; de Ceballos, M. L. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 1904-13.
96. Benito, C.; Tolón, R. M.; Pazos, M. R.; Nuñez, E.; Castillo, A. I.; Romero, J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 277-85.

97. Ashton, J. C.; Glass, M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **2007**, *5*, 73-80.
98. Marchalant, Y.; Cerbai, F.; Brothers, H. M.; Wenk, G. L. Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. *Neurobiol. Aging* **2008**, *29*, 1894-1901.
99. Ehrhart, J.; Obregón, D.; Mori, T.; Hou, H.; Sun, N.; Bai, Y.; Klein, T.; Fernández, F.; Tan, J.; Shytle, R. D. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J. Neuroinflammation* **2005**, *2*, 29.
100. Milton, N. G. N. Phosphorylated amyloid-beta: the toxic intermediate in alzheimer's disease neurodegeneration. *Subcell. Biochem.* **2005**, *38*, 381-402.
101. Huang, H.-C.; Jiang, Z.-F. Accumulated Amyloid-beta Peptide and Hyperphosphorylated Tau Protein: Relationship and Links in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *16*, 15-27.
102. Esposito, G.; De Filippis, D.; Carnuccio, R.; Izzo, A. A.; Iuvone, T. The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells. *J. Mol. Med. (Berl.)* **2006**, *84*, 253-258.
103. Lovell, M. A.; Xiong, S. L.; Xie, C. S.; Davies, P.; Markesbery, W. R. Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J. Alzheimer's Dis.* **2004**, *6*, 659-671.
104. Ozaita, A.; Puighermanal, E.; Maldonado, R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1105-1114.
105. Abood, M. E.; Rizvi, G.; Sallapudi, N.; McAllister, S. D. Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neurosci. Lett.* **2001**, *309*, 197-201.
106. Nagayama, T.; Sinor, A. D.; Simon, R. P.; Chen, J.; Graham, S. H.; Jin, K.; Greenberg, D. A. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 2987-95.
107. Shen, M.; Thayer, S. A. Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 459-62.
108. Sinor, A. D.; Irvin, S. M.; Greenberg, D. A. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* **2000**, *278*, 157-60.
109. Gotz, M.; Huttner, W. B. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 777-788.

110. Jiang, W.; Zhang, Y.; Xiao, L.; Van Cleemput, J.; Ji, S. P.; Bai, G.; Zhang, X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 3104-3116.
111. Palazuelos, J.; Ortega, Z.; Diaz-Alonso, J.; Guzman, M.; Galve-Roperh, I. CB2 Cannabinoid Receptors Promote Neural Progenitor Cell Proliferation via mTORC1 Signaling. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1198-1209.
112. Fodale, V.; Quattrone, D.; Trecroci, C.; Caminiti, V.; Santamaria, L. B. Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *Br. J. Anaesth.* **2006**, *97*, 445-52.
113. Power, A. E. Muscarinic cholinergic contribution to memory consolidation: with attention to involvement of the basolateral amygdala. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 987-96.
114. Ezoulin, J. M. M.; Shao, B.-y.; Xia, Z.; Xie, Q.; Li, J.; Cui, Y.-y.; Wang, H.; Dong, C.-z.; Zhao, Y.-x.; Massicot, F.; Qiu, Z.-b.; Heymans, F.; Chen, H.-z. Novel piperazine derivative PMS1339 exhibits tri-functional properties and cognitive improvement in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2009**, *12*, 1409-1419.
115. De Ferrari, G. V.; Canales, M. A.; Shin, I.; Weiner, L. M.; Silman, I.; Inestrosa, N. C. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40*, 10447-57.
116. Álvarez, A.; Opazo, C.; Alarcón, R.; Garrido, J.; Inestrosa, N. C. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 348-61.
117. Castro, A.; Martínez, A. Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 267-72.
118. Sáez-Valero, J.; Fodero, L. R.; Sjogren, M.; Andreassen, N.; Amici, S.; Gallai, V.; Vanderstichele, H.; Vanmechelen, E.; Parnetti, L.; Blennow, K.; Small, D. H. Glycosylation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase changes as a function of the duration of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *72*, 520-526.
119. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q. S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; Chen, D.; Furukawa, K.; Sambamurti, K.; Brossi, A.; Lahiri, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 17213-8.
120. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Yu, Q. S.; Zhu, X. X.; Holloway, H. W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D. K.; Lahiri, D. K. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* **2001**, *17*, 159-165.
121. Giacobini, E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase - A valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs Aging* **2001**, *18*, 891-898.

122. Eubanks, L. M.; Rogers, C. J.; Beuscher, A. E. t.; Koob, G. F.; Olson, A. J.; Dickerson, T. J.; Janda, K. D. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 773-7.
123. Showalter, V. M.; Compton, D. R.; Martin, B. R.; Abood, M. E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 989-99.
124. Ueda, Y.; Miyagawa, N.; Matsui, T.; Kaya, T.; Iwamura, H. Involvement of cannabinoid CB(2) receptor-mediated response and efficacy of cannabinoid CB(2) receptor inverse agonist, JTE-907, in cutaneous inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *520*, 164-71.
125. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
126. Giacobini, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res.* **2004**, *50*, 433-440.
127. Rampa, A.; Piazza, L.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Bisi, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Cavrini, V.; Cavalli, A.; Recanatini, M.; Valenti, P. Acetylcholinesterase inhibitors: SAR and kinetic studies on omega-[N-methyl-N-(3-alkylcarbamoyloxyphenyl)methyl]aminoalkoxyaryl derivatives. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3810-20.
128. Melchiorre, C.; Andrisano, V.; Bolognesi, M. L.; Budriesi, R.; Cavalli, A.; Cavrini, V.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M. Acetylcholinesterase noncovalent inhibitors based on a polyamine backbone for potential use against Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4186-9.
129. Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 407-16.
130. SYBYL 6.9, Tripos Inc., St. Louis, Missouri, USA.
131. Kryger, G.; Harel, M.; Giles, K.; Toker, L.; Velan, B.; Lazar, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Ariel, N.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 1385-94.
132. Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141-7.
133. Shoichet, B. K.; McGovern, S. L.; Wei, B. Q.; Irwin, J. J. Lead discovery using molecular docking. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 439-446.

134. Kolb, P.; Ferreira, R. S.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 429-436.
135. Tan, L.; Batista, J.; Bajorath, J. Computational Methodologies for Compound Database Searching that Utilize Experimental Protein-Ligand Interaction Information. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *76*, 191-200.
136. Kroemer, R. T. Structure-based drug design: Docking and scoring. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, *8*, 312-328.
137. Halperin, I.; Ma, B. Y.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2002**, *47*, 409-443.
138. de Graaf, C.; Rognan, D. Customizing G Protein-Coupled Receptor Models for Structure-Based Virtual Screening. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 4026-4048.
139. Worth, C. L.; Kleinau, G.; Krause, G. Comparative Sequence and Structural Analyses of G-Protein-Coupled Receptor Crystal Structures and Implications for Molecular Models. *PLoS ONE* **2009**, *4*.
140. Lutz, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2002**, *66*, 123-142.
141. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
142. Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Entel, P.; Buss, V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 angstrom crystal structure. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571-583.
143. Scheerer, P.; Park, J. H.; Hildebrand, P. W.; Kim, Y. J.; Krauss, N.; Choe, H.-W.; Hofmann, K. P.; Ernst, O. P. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **2008**, *455*, 497-U30.
144. Topiol, S.; Sabio, M. X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 11-20.
145. Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. High-resolution crystal structure of an engineered human beta(2)-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.
146. Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Griffith, M. T.; Roth, C. B.; Jaakola, V. P.; Chien, E. Y. T.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 angstrom structure of the human beta(2)-adrenergic receptor. *Structure* **2008**, *16*, 897-905.

147. Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y. T.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A(2A) Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* **2008**, *322*, 1211-1217.
148. Xie, X. Q.; Chen, J. Z.; Billings, E. M. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2003**, *53*, 307-319.
149. Tuccinardi, T.; Ferrarini, P. L.; Manera, C.; Ortore, G.; Saccomanni, G.; Martinelli, A. Cannabinoid CB2/CB1 selectivity. Receptor modeling and automated docking analysis. *J. Med. Chem* **2006**, *49*, 984-994.
150. Raitio, K. H.; Salo, O. M. H.; Nevalainen, T.; Poso, A.; Jarvinen, T. Targeting the cannabinoid CB2 receptor: Mutations, modeling and development of CB2 selective ligands. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1217-1237.
151. Montero, C.; Campillo, N. E.; Goya, P.; Páez, J. A. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *J. Med. Chem* **2005**, *40*, 75-83.
152. McAllister, S. D.; Tao, Q.; Barnett-Norris, J.; Buehner, K.; Hurst, D. P.; Guarnieri, F.; Reggio, P. H.; Harmon, K. W. N.; Cabral, G. A.; Abood, M. E. A critical role for a tyrosine residue in the cannabinoid receptors for ligand recognition. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 2121-2136.
153. McAllister, S. D.; Rizvi, G.; Anavi-Goffer, S.; Hurst, D. P.; Barnett-Norris, J.; Lynch, D. L.; Reggio, P. H.; Abood, M. E. An aromatic microdomain at the cannabinoid CB1 receptor constitutes an agonist/inverse agonist binding region. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5139-5152.
154. Bramblett, R. D.; Panu, A. M.; Ballesteros, J. A.; Reggio, P. H. Construction of a 3d Model of the Cannabinoid Cb1 Receptor - Determination of Helix Ends and Helix Orientation. *Life Sci.* **1995**, *56*, 1971-1982.
155. Song, Z. H.; Slowey, C. A.; Hurst, D. P.; Reggio, P. H. The difference between the CB1 and CB2 cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB2. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 834-840.
156. Mahmoudian, M. The cannabinoid receptor: Computer-aided molecular modeling and docking of ligand. *J. Mol. Graph. Model.* **1997**, *15*, 149-+.
157. Henderson, R.; Baldwin, J. M.; Ceska, T. A.; Zemlin, F.; Beckmann, E.; Downing, K. H. Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-Resolution Electron Cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 899-929.
158. Zhang, R. D.; Hurst, D. P.; Barnett-Norris, J.; Reggio, P. H.; Song, Z. H. Cysteine 2.59(89) in the second transmembrane domain of human CB2 receptor is accessible within the ligand binding crevice: Evidence for possible CB2 deviation from a rhodopsin template. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 69-83.

159. Yates, A. S.; Doughty, S. W.; Kendall, D. A.; Kellam, B. Chemical modification of the naphthoyl 3-position of JWH-015: In search of a fluorescent probe to the cannabinoid CB2 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3758-3762.
160. Shim, J. Y.; Welsh, W. J.; Howlett, A. C. Homology model of the CB1 cannabinoid receptor: Sites critical for nonclassical cannabinoid agonist interaction. *Biopolymers* **2003**, *71*, 169-189.
161. Salo, O. M. H.; Raitio, K. H.; Savinainen, J. R.; Nevalainen, T.; Lahtela-Kakkonen, M.; Laitinen, J. T.; Jarvinen, T.; Poso, A. Virtual screening of novel CB2 ligands using a comparative model of the human cannabinoid CB2 receptor. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7166-7171.
162. Salo, O. M. H.; Lahtela-Kakkonen, M.; Gynther, J.; Jarvinen, T.; Poso, A. Development of a 3D model for the human cannabinoid CB1 receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3048-3057.
163. Raduner, S.; Majewska, A.; Chen, J. Z.; Xie, X. Q.; Hamon, J.; Faller, B.; Altmann, K. H.; Gertsch, J. Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics - Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14192-14206.
164. Hurst, D. P.; Lynch, D. L.; Barnett-Norris, J.; Hyatt, S. M.; Seltzman, H. H.; Zhong, M.; Song, Z. H.; Nie, J. J.; Lewis, D.; Reggio, P. H. N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A) interaction with LYS 3.28(192) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB1 receptor. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1274-1287.
165. Dainese, E.; Oddi, S.; Maccarrone, M. Lipid-mediated dimerization of beta(2)-adrenergic receptor reveals important clues for cannabinoid receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2277-2279.
166. Rosenbaum, D. M.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Yao, X. J.; Weis, W. I.; Stevens, R. C.; Kobilka, B. K. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta(2)-adrenergic receptor function. *Science* **2007**, *318*, 1266-1273.
167. Colquhoun, D. Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 924-947.
168. Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 90-113.
169. Dror, R. O.; Arlow, D. H.; Borhani, D. W.; Jensen, M. O.; Piana, S.; Shaw, D. E. Identification of two distinct inactive conformations of the beta(2)-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 4689-4694.

170. Song, Z. H.; Bonner, T. I. A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 891-896.
171. Poso, A.; Huffman, J. W. Targeting the cannabinoid CB2 receptor: modelling and structural determinants of CB2 selective ligands. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 335-346.
172. Sansom, M. S. P.; Weinstein, H. Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 445-451.
173. Singh, R.; Hurst, D. P.; Barnett-Norris, J.; Lynch, D. L.; Reggio, P. H.; Guarnieri, F. Activation of the cannabinoid CB1 receptor may involve a W6.48/F3.36 rotamer toggle switch. *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 357-370.
174. Park, J. H.; Scheerer, P.; Hofmann, K. P.; Choe, H.-W.; Ernst, O. P. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **2008**, *454*, 183-U33.
175. Lodowski, D. T.; Angel, T. E.; Palczewski, K. Comparative Analysis of GPCR Crystal Structures. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 425-430.
176. Ramos, J.; Cruz, V. L.; Martinez-Salazar, J.; Campillo, N. E.; Paez, J. A. Dissimilar interaction of CB1/CB2 with lipid bilayers as revealed by molecular dynamics simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 3660-8.
177. Halgren, T. A. Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.
178. Halgren, T. A. Merck molecular force field .2. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 520-552.
179. Halgren, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720-729.
180. Judson, R. *Genetic Algorithms and Their Use in Chemistry in Reviews in Computational Chemistry*. K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd ed.; VCH Publishers: **1997**; Vol. 10.
181. Lavigne, P.; Bagu, J. R.; Boyko, R.; Willard, L.; Holmes, C. F.; Sykes, B. D. Structure-based thermodynamic analysis of the dissociation of protein phosphatase-1 catalytic subunit and microcystin-LR docked complexes. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 252-64.
182. Fischer, E.; Blochmann, R. Some new indazol derivative. *Ber. Deutsch. Ges. Chem.* **1902**, *35*, 2315-2319.
183. Evans, N. A.; Whelan, D. J.; Johns, R. B. tautomerism in 5-pyrazolone series 1(H)-5-pyrazolones and indazolones. *Tetrahedron* **1965**, *21*, 3351-8.
184. J. Elguero, C. M., A. R. Katritzky, P. Linda. *The Tautomerism of Heterocycles*. N. Y., **1976**; p 352.

185. Baiocchi, L.; Corsi, G.; Palazzo, G. Synthesis, Properties, and Reactions of 1h-Indazol-3-Ols and 1,2-Dihydro-3h-Indazol-3-Ones. *Synthesis-Stuttgart* **1978**, 633-648.
186. Stephenson, E. F. M. Indazole. *Org. Synth.* **1949**, 29, 54-58.
187. Pfannstiel, K.; Janecke, J. Representation of o-hydrazino-benzoic acids and indazolones by reduction of diazotated anthranilic acids with sulphuric acid. *Ber. Dtsch. Chem Ges.* **1942**, 75, 1096-1107.
188. Wyrick, S. D.; Voorstad, P. J.; Cocolas, G.; Hall, I. H. Hypolipidemic Activity of Phtalamide derivatives. Structure Activity studies of indazolone analogs. *J. Med. Chem* **1984**, 27, 768-772.
189. Stiff, C.; Graber, D. R.; Thorarensen, A.; Wakefield, B. D.; Marotti, K. R.; Melchior, E. P.; Sweeney, M. T.; Han, F.; Rohrer, D. C.; Zurenko, G. E.; Romero, D. L. Bacterial translation inhibitors, 1-acylindazol-3-ols as anthranilic acid mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 6293-6297.
190. Schindler, R.; Fleischhauer, I.; Hofgen, N.; Sauer, W.; Egerland, U.; Poppe, H.; Heer, S.; Szelenyi, I.; Kutscher, B.; Engel, J. 1,5-Disubstituted indazol-3-ols with anti-inflammatory activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1998**, 331, 13-21.
191. Paterson, T. M.; Smalley, R. K.; Suschitzky, H. Deazidation of aryl azides with hydrazine hydrate: New synthesis of 3-aminoindazole. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 3973-3976.
192. Cui, J. R. J.; Araldi, G. L.; Reiner, J. E.; Reddy, K. M.; Kemp, S. J.; Ho, J. Z.; Siev, D. V.; Mamedova, L.; Gibson, T. S.; Gaudette, J. A.; Minami, N. K.; Anderson, S. M.; Bradbury, A. E.; Nolan, T. G.; Semple, J. E. Non-covalent thrombin inhibitors featuring P-3-heterocycles with P-1-bicyclic arginine surrogates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2925-2930.
193. Arán, V. J.; Flores, M.; Munoz, P.; Páez, J. A.; SánchezVerdú, P.; Stud, M. Analogues of cytostatic, fused indazolinones: Synthesis, conformational analysis and cytostatic activity against HeLa cells of some 1-substituted indazolols, 2-substituted indazolinones, and related compounds. *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 683-691.
194. Zoni, G.; Picciola, G. Alkylation of 3-hydroxy-1H-1-substituted-indazole. *Farmaco Ed. Sci.* **1968**, 23, 490-&.
195. Soga, T.; Niwa, H.; Shiraishi, T. Synthesis of 1-substituted 3-(dialkylaminoalkoxy)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indazoles. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, 53, 825-826.
196. Schmutz, J.; Michaelis, W.; Hunziker, F. Über Die Alkylierung Von Indazolonen. *Helv. Chim. Acta* **1964**, 47, 1986-&.
197. Rodríguez, J.; Gerpe, A.; Aguirre, G.; Kemmerling, U.; Piro, O. E.; Arán, V. J.; Diego Maya, J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. Study of 5-nitroindazoles' anti-

- Trypanosoma cruzi mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1545-1553.
198. Dumitrascu, F.; Plaveti, M.; Raileanu, D. New convenient methods for the synthesis of 1,2-dihydro-3H-indazol-3-one and its 1-acyl derivatives. *Rev. Roum. Chim.* **1991**, *36*, 917-923.
 199. Cerecetto, H.; Gerpe, A.; Gonzalez, M.; Aran, V. J.; de Ocariz, C. O. Pharmacological properties of indazole derivatives: Recent developments. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 869-878.
 200. Bruneau, P.; Delvare, C.; Edwards, M. P.; McMillan, R. M. Indazolinones, a new series of redox-active 5-lipoxygenase inhibitors with built-in selectivity and oral activity. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1028-1036.
 201. Bonanomi, M.; Palazzo, G. Products of reaction between 1H-indazol-3-ol and ethyl chloroacetate. *Farmaco Ed. Sci.* **1977**, *32*, 490-501.
 202. Arán, V. J.; Ochoa, C.; Boiani, L.; Buccino, P.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; González, M.; Montero, D.; Nogal, J. J.; Gomez-Barrio, A.; Azqueta, A.; de Cerain, A. L.; Piro, O. E.; Castellano, E. E. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3197-3207.
 203. Anderson, R. M.; Leverett, B. R. 1-methylsulphonyl- and 1-phenylsulphonyl-indazolin-3-ones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1971**, 3313-&.
 204. Adger, B. M.; Bradbury, S.; Keating, M.; Rees, C. W.; Storr, R. C. 1,2,3-benzotriazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 31-40.
 205. Selwood, D. L.; Brummell, D. G.; Budworth, J.; Burtin, G. E.; Campbell, R. O.; Chana, S. S.; Charles, I. G.; Fernandez, P. A.; Glen, R. C.; Goggin, M. C.; Hobbs, A. J.; Kling, M. R.; Liu, Q.; Madge, D. J.; Meillerais, S.; Powell, K. L.; Reynolds, K.; Spacey, G. D.; Stables, J. N.; Tatlock, M. A.; Wheeler, K. A.; Wishart, G.; Woo, C. K. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoles and indazoles as activators of the nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 78-93.
 206. ACRAF. Indazole derivatives. GB1088973, **1967**.
 207. Kruszewska, H.; Zareba, T.; Tyski, S. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol. Pharm.* **2002**, *59*, 436-9.
 208. Choong, I. G., S. Methods and compositions of treating a flaviviridae family viral infection. 20100015093, **2010**.
 209. Arán, V. J.; Asensio, J. L.; Ruiz, J. R.; Stud, M. Reactivity of 1,1-disubstituted indazol-3-ylidene oxides: Synthesis of some substituted indazolols and indazolinones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 1119-1127.

210. Shakhnes, A. K.; Vorobev, S. S.; Shevelev, S. A. Selective reduction of one, two, or three nitro groups in 1,3,5-trinitrobenzene with hydrazine hydrate. *Russ. Chem. Bull.* **2006**, *55*, 938-939.
211. Lauwiner, M.; Rys, P.; Wissmann, J. Reduction of aromatic nitro compounds with hydrazine hydrate in the presence of an iron oxide hydroxide catalyst. I. The reduction of monosubstituted nitrobenzenes with hydrazine hydrate in the presence of ferrihydrite. *Appl. Catal., A* **1998**, *172*, 141-148.
212. Tanemura, K.; Suzuki, T.; Nishida, Y.; Satsumabayashi, K.; Horaguchi, T. Halogenation of aromatic compounds by N-chloro-, N-bromo-, and N-iodosuccinimide. *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 932-933.
213. Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Elrick, D. B.; Mechoulam, R.; Corbett, A. D. Inhibitory Effects of Certain Enantiomeric Cannabinoids in the Mouse Vas-Deferens and the Myenteric Plexus Preparation of Guinea-Pig Small-Intestine. *Br. J. Pharmacol.* **1992**, *105*, 980-984.
214. Grigoryan, H. A.; Hambardzumyan, A. A.; Mkrtchyan, M. V.; Topuzyan, V. O.; Halebyan, G. P.; Asatryan, R. S. α,β -dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *171*, 108-116.
215. Colletier, J.-P.; Fournier, D.; Greenblatt, H. M.; Stojan, J.; Sussman, J. L.; Zaccari, G.; Silman, I.; Weik, M. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2746-2756.
216. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619-26.
217. BMG-LABTECH. Assay on the FLUOstar OPTIMA to Determine Antioxidant Capacity. **2006**.
218. Maron, D. M.; Ames, B. N. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat. Res.* **1983**, *113*, 173-215.
219. Gouldson, P.; Calandra, B.; Legoux, P.; Kerneis, A.; Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Shire, D. Mutational analysis and molecular modelling of the antagonist SR 144528 binding site on the human cannabinoid CB2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *401*, 17-25.
220. Sobolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.; Abola, E. E.; Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* **1999**, *15*, 327-32.
221. Masson, P.; Froment, M. T.; Bartels, C. F.; Lockridge, O. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 36-48.

222. McPherson, A. *Preparation and analysis of protein crystals*. Wiley-Interscience Publications ed.; **1982**.
223. Jancarik, J.; Kim, S. H. Sparse- matrix Samplin:- A Screening Method for Crystallization of Proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 409-411.
224. Bailey, S. The CCP4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760-763.
225. Patterson, A. L. A direct method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Z. Kristallog.* **1935**, *90*, 517-542.
226. Okada, T.; Le Trong, I.; Fox, B. A.; Behnke, C. A.; Stenkamp, R. E.; Palczewski, K. X-ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 73-80.
227. Gorrec, F.; Palmer, C. M.; Lebon, G.; Warne, T. Pi sampling: a methodical and flexible approach to initial macromolecular crystallization screening. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 463-470.
228. Lebon, G.; Warne, T.; Edwards, P. C.; Bennett, K.; Langmead, C. J.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G. Agonist-bound adenosine A(2A) receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **2011**, *474*, 521-U154.
229. Landau, E. M.; Rosenbusch, J. P. Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 14532-14535.
230. Shimamura, T.; Shiroishi, M.; Weyand, S.; Tsujimoto, H.; Winter, G.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Liu, W.; Han, G. W.; Kobayashi, T.; Stevens, R. C.; Iwata, S. Structure of the human histamine H(1) receptor complex with doxepin. *Nature* **2011**, *475*, 65-U82.
231. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22*, 3099-108.
232. Thomas, A.; Pertwee, R. G. The bioassay of cannabinoids using the mouse isolated vas deferens. *Methods Mol. Med.* **2006**, *123*, 191-207.
233. Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Lainton, J. A. H.; Huffman, J. W. Pharmacological Characterization of 3 Novel Cannabinoid Receptor Agonists in the Mouse Isolated Vas-Deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *284*, 241-247.
234. Griffin, G.; Fernando, S. R.; Ross, R. A.; McKay, N. G.; Ashford, M. L. J.; Shire, D.; Huffman, J. W.; Yu, S.; Lainton, J. A. H.; Pertwee, R. G. Evidence for the presence of CB₂-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *339*, 53-61.

235. Hughes, J.; Kosterlitz, H. W.; Leslie, F. M. Effect of Morphine on Adrenergic Transmission in Mouse Vas-Deferens Assessment of Agonist and Antagonist Potencies of Narcotic Analgesics. *Br. J. Pharmacol.* **1975**, *53*, 371-381.
236. McCann, J.; Ames, B. N. Detection of Mutagenic Metabolites of Carcinogens in Urine with Salmonella-Microsome Test. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *269*, 21-25.
237. Chu, K. C.; Patel, K. M.; Lin, A. H.; Tarone, R. E.; Linhart, M. S.; Dunkel, V. C. Evaluating Statistical-Analysis and Reproducibility of Microbial Mutagenicity Assays *Mutat. Res.* **1981**, *85*, 119-132.
238. Okada, T.; Fujiyoshi, Y.; Silow, M.; Navarro, J.; Landau, E. M.; Shichida, Y. Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 5982-5987.
239. Li, J.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Villa, C.; Schertler, G. F. X. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1409-1438.
240. Salom, D.; Lodowski, D. T.; Stenkamp, R. E.; Le Trong, I.; Golczak, M.; Jastrzebska, B.; Harris, T.; Ballesteros, J. A.; Palczewski, K. Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16123-16128.
241. Standfuss, J.; Xie, G.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Oprian, D. D.; Schertler, G. F. X. Crystal structure of a thermally stable rhodopsin mutant. *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 1179-1188.
242. Shimamura, T.; Hiraki, K.; Takahashi, N.; Hori, T.; Ago, H.; Masuda, K.; Takio, K.; Ishiguro, M.; Miyano, M. Crystal structure of squid rhodopsin with intracellularly extended cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17753-17756.
243. Murakami, M.; Kouyama, T. Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* **2008**, *453*, 363-U33.
244. Rasmussen, S. G. F.; Choi, H.-J.; Rosenbaum, D. M.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Ratnala, V. R. P.; Sanishvili, R.; Fischetti, R. F.; Schertler, G. F. X.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Crystal structure of the human beta(2) adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2007**, *450*, 383-U4.
245. Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. High-resolution crystal structure of an engineered human beta(2)-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.
246. Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G.; Schertler, G. F. X. Structure of a beta(1)-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2008**, *454*, 486-U2.

247. Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Griffith, M. T.; Roth, C. B.; Jaakola, V.-P.; Chien, E. Y. T.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 angstrom structure of the human beta(2)-adrenergic receptor. *Structure* **2008**, *16*, 897-905.
248. Bokoch, M. P.; Zou, Y.; Rasmussen, S. G. F.; Liu, C. W.; Nygaard, R.; Rosenbaum, D. M.; Fung, J. J.; Choi, H.-J.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Puglisi, J. D.; Weis, W. I.; Pardo, L.; Prosser, R. S.; Mueller, L.; Kobilka, B. K. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **2010**, *463*, 108-U121.
249. Wacker, D.; Fenalti, G.; Brown, M. A.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Conserved Binding Mode of Human beta(2) Adrenergic Receptor Inverse Agonists and Antagonist Revealed by X-ray Crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11443-11445.
250. Wu, B.; Chien, E. Y. T.; Mol, C. D.; Fenalti, G.; Liu, W.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Brooun, A.; Wells, P.; Bi, F. C.; Hamel, D. J.; Kuhn, P.; Handel, T. M.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. *Science* **2010**, *330*, 1066-1071.
251. Makino, C. L.; Riley, C. K.; Looney, J.; Crouch, R. K.; Okada, T. Binding of More Than One Retinoid to Visual Opsins. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 2366-2373.
252. Rasmussen, S. G. F.; Choi, H.-J.; Fung, J. J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P. S.; DeVree, B. T.; Rosenbaum, D. M.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Schnapp, A.; Konetzki, I.; Sunahara, R. K.; Gellman, S. H.; Pautsch, A.; Steyaert, J.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* **2011**, *469*, 175-180.
253. Rosenbaum, D. M.; Zhang, C.; Lyons, J. A.; Holl, R.; Aragao, D.; Arlow, D. H.; Rasmussen, S. G. F.; Choi, H.-J.; DeVree, B. T.; Sunahara, R. K.; Chae, P. S.; Gellman, S. H.; Dror, R. O.; Shaw, D. E.; Weis, W. I.; Caffrey, M.; Gmeiner, P.; Kobilka, B. K. Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* **2011**, *469*, 236-240.
254. Warne, T.; Moukhametzianov, R.; Baker, J. G.; Nehme, R.; Edwards, P. C.; Leslie, A. G. W.; Schertler, G. F. X.; Tate, C. G. The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature* **2011**, *469*, 241-244.
255. Choe, H.-W.; Kim, Y. J.; Park, J. H.; Morizumi, T.; Pai, E. F.; Krauss, N.; Hofmann, K. P.; Scheerer, P.; Ernst, O. P. Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* **2011**, *471*, 651-U137.
256. Standfuss, J.; Edwards, P. C.; D'Antona, A.; Fransen, M.; Xie, G.; Oprian, D. D.; Schertler, G. F. X. The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* **2011**, *471*, 656-660.

257. Xu, F.; Wu, H.; Katritch, V.; Han, G. W.; Jacobson, K. A.; Gao, Z.-G.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of an Agonist-Bound Human A(2A) Adenosine Receptor. *Science* **2011**, *332*, 322-327.
258. Dore, A. S.; Robertson, N.; Errey, J. C.; Ng, I.; Hollenstein, K.; Tehan, B.; Hurrell, E.; Bennett, K.; Congreve, M.; Magnani, F.; Tate, C. G.; Weir, M.; Marshall, F. H. Structure of the Adenosine A(2A) Receptor in Complex with ZM241385 and the Xanthines XAC and Caffeine. *Structure* **2011**, *19*, 1283-1293.

